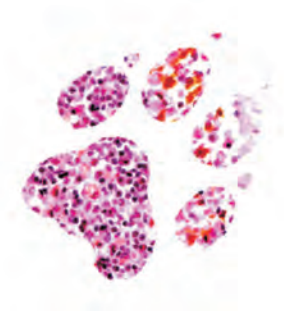
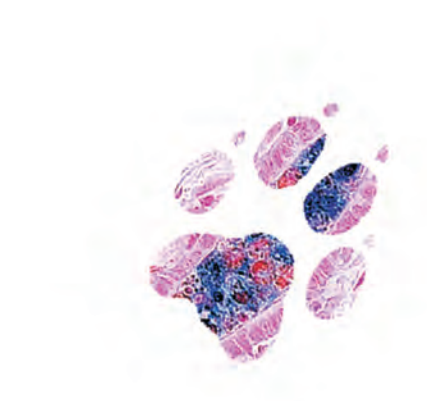


UNTERSUCHUNGEN ZUR EISENSPEICHERUNG IN MAMMALYMPHKNOTEN DES HUNDES

FELI MASCHA WALTHER



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2009

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

Untersuchungen zur Eisenspeicherung in Mammalymphknoten des Hundes

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Feli Mascha Walther

Tierärztin aus Georgsmarienhütte

Gießen, 2009

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

Tag der Disputation: 23.11.2009

Erklärung:

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt habe, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der *Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis* niedergelegt sind, eingehalten.“

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1. Eisenstoffwechsel.....	2
2.1.1. Ferritin.....	2
2.1.1.1. Vorkommen.....	2
2.1.1.2. Synthese.....	2
2.1.1.3. Funktion.....	3
2.1.1.4. Abbau.....	4
2.1.1.5. Nachweis.....	4
2.1.2. Hämosiderin.....	4
2.1.2.1. Vorkommen.....	4
2.1.2.2. Synthese.....	7
2.1.2.3. Funktion.....	8
2.1.2.4. Abbau.....	8
2.1.2.5. Nachweis.....	9
2.1.3. Laktoferrin.....	9
2.1.3.1. Vorkommen.....	9
2.1.3.2. Synthese.....	10
2.1.3.3. Funktion.....	11
2.1.3.4. Abbau.....	12
2.1.3.5. Nachweis.....	13
2.2. Histologische Eisenfärbungen.....	13
2.2.1. Berliner Blau-Reaktion.....	13
2.2.2. Turnbolls Blau-Reaktion.....	14
2.2.3. Quinckes-Reaktion.....	15
2.2.4. Intrazelluläres, Berliner Blau-negatives, braunes Pigment	15
2.2.4.1. Aposiderin	15
2.2.4.2. Lipopigmente.....	16
2.2.4.3. Melanin.....	18
2.3. Untersuchte canine Lymphknoten.....	19
2.4. Milchdrüse.....	21
2.4.1. Lymphdrainage.....	21
2.4.2. Mammatumoren.....	21

3. Material und Methoden.....	24
3.1. Material.....	24
3.1.1. Hunde mit Mammatumoren (Fälle).....	24
3.1.2. Zur Sektion eingesandte Hunde (Kontrollen).....	25
3.1.3. Daten über untersuchte Hunde.....	25
3.2. Methoden.....	26
3.2.1. Präparation der Gewebe.....	26
3.2.2. Histologische Färbungen.....	26
3.2.2.1. Berliner Blau-Reaktion.....	26
3.2.2.2. Turnbolls Blau-Reaktion.....	27
3.2.2.3. Quinckes-Reaktion.....	28
3.2.2.4. Hämatoxylin-Eosin.....	28
3.2.2.5. Kontrollen für Aposiderin.....	28
3.2.2.6. Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion.....	29
3.2.2.7. Bleichen.....	29
3.2.2.8. Long Ziehl-Neelsen-Reaktion.....	30
3.2.3. Fluoreszenzmikroskopie.....	31
3.2.4. Immunhistologie.....	31
3.2.4.1. Zum Nachweis von caninem Laktoferrin verwendete Materialien.....	32
3.2.4.2. Laborprotokoll der Immunhistologie.....	34
3.2.5. Histologische Untersuchung.....	35
3.2.5.1. Berliner Blau-Reaktion.....	35
3.2.5.1.1. <i>Lymphknoten</i>	35
3.2.5.1.2. <i>Milz</i>	36
3.2.5.1.3. <i>Mammatumoren und unverändertes Milchdrüsengewebe</i>	36
3.2.5.2. Turnbolls Blau-Reaktion.....	37
3.2.5.3. Quinckes-Reaktion.....	37
3.2.5.4. Hämatoxylin-Eosin.....	37
3.2.5.4.1. <i>Lymphknoten</i>	37
3.2.5.4.2. <i>Milz</i>	37
3.2.5.5. Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion.....	37
3.2.5.6. Bleichen.....	38
3.2.5.7. Long Ziehl-Neelsen-Reaktion.....	38
3.2.5.8. Fluoreszenzmikroskopie.....	38
3.2.5.9. Immunhistologie.....	38
3.2.5.9.1. <i>Lymphknoten und Milz</i>	38

3.2.5.9.2. Mammatumoren und unverändertes Milchdrüsengewebe.....	39
3.2.6. Statistische Auswertung.....	40
4. Ergebnisse.....	42
4.1. Fragebogendaten.....	42
4.1.1. Fälle (Hunde mit Mammatumoren).....	42
4.1.2. Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren).....	43
4.2. Ergebnisse der histologischen Untersuchung.....	44
4.2.1. Histologische Befunde der Fälle	44
4.2.1.1. Lymphknoten.....	44
4.2.1.2. Mammatumoren.....	49
4.2.1.3. Unverändertes Milchdrüsengewebe.....	54
4.2.2. Histologische Befunde der Kontrollen	55
4.2.2.1. Lymphknoten und Milz.....	55
4.2.2.2. BBn-Pigment.....	58
4.3. Ergebnisse der statistischen Auswertung.....	61
4.3.1. Altersstruktur der Fälle und Kontrollen.....	62
4.3.2. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Ausbildung von Mammatumoren in der Milchdrüse	63
4.3.3. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Geschlecht der Hunde.....	66
4.3.4. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit einer Kastration der Hunde.....	69
4.3.5. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Geschlechtsreife der Hunde.....	70
4.3.6. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten und Milzen mit dem Alter der Hunde.....	72
4.3.7. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Regelmäßigkeit der Läufigkeit der Hunde.....	73
4.3.8. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Zeit seit der letzten Läufigkeit der Hunde.....	75

4.3.9. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Auftreten von Scheinträchtigkeiten der Hunde....	76
4.3.10. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen im Einzugsgebiet der Lymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten.....	78
4.3.11. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Erhalt einer Bluttransfusion.....	81
4.3.12. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Todesart der Hunde.....	83
4.3.13. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Frischegrad dieser Lymphknoten.....	85
4.3.14. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten mit der Lokalisation der Lymphknoten.....	87
4.3.15. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Hämosiderosegrad weiterer untersuchter Lymphknoten.....	89
4.3.16. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten mit der Speicherung BBn-Pigments in den selben Lymphknoten.....	91
4.3.17. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten und Milzen mit dem Auftreten von Neoplasien, neutrophilen Granulozyten und weiteren Veränderungen in den selben Geweben.....	93
4.3.17.1. Neoplasien.....	93
4.3.17.2. Neutrophile Granulozyten.....	95
4.3.17.3. Weitere Veränderungen.....	96
4.3.18. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten und Milzen mit dem Auftreten von Laktoferrin in den selben Geweben.....	98
4.3.19. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Hämosiderosegrad der Milz.....	100
4.3.20. Assoziation der Eisenspeicherung in caninen Mammatumoren mit der Eisenspeicherung im zugehörigen unveränderten Milchdrüsengewebe.....	101

4.3.21. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder im Mammatumor des selben Hundes.....	102
4.3.22. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten und Milzen mit dem Auftreten von hämosiderinhaltigem Bindegewebe in den selben Gewebeschnitten.....	105
4.3.23. Assoziation der Eisenspeicherung in caninen Mammatumoren mit der Tumorart.....	107
4.3.24. Assoziation der Eisenspeicherung in caninen Mammatumoren mit dem Auftreten von Laktoferrin in den selben Tumoren in der selben Lokalisation. .	108
4.3.25. Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in caninen Lymphknoten mit dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten in den selben Lymphknoten. .	109
4.3.26. Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in caninen oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Auftreten von Laktoferrin im Milchdrüsengewebe und/oder im Mammatumor des selben Hundes.....	110
4.3.27. Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in caninen Mammatumoren mit der Mammatumorart.....	111
4.3.28. Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in caninen Lymphknoten mit dem Alter der Hunde.....	112
4.3.29. Assoziation der Speicherung BBn-Pigments in caninen Lymphknoten mit dem Alter der Hunde.....	113
4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung.....	114
4.4.1. Statistische signifikante Assoziationen ($p \leq 0,05$).....	114
4.4.2. Knapp nicht statistisch signifikante Assoziationen ($p = 0,051 - 0,099$).....	115
5. Diskussion.....	116
5.1. Identität des Pigments.....	116
5.1.1. Berliner Blau-positives Pigment.....	116
5.1.2. Turnbills Blau-Reaktion.....	121
5.1.3. Berliner Blau-negatives Pigment.....	122
5.2. Ursachen der Pigmentspeicherung.....	123

5.2.1. Tumorentwicklung.....	123
5.2.2. Hormonelle Ursachen.....	124
5.2.3. Weitere mögliche Ursachen der Hämosiderinspeicherung.....	125
5.2.3.1. Alter.....	125
5.2.3.2. Lokalisation der Lymphknoten sowie Hämosiderosegrad weiterer untersuchter Gewebe.....	126
5.2.3.3. Entzündung, Hyperämie, Blutung.....	127
5.2.3.4. Bluttransfusion.....	127
5.2.3.5. Todesart und Frischegrad.....	128
5.2.3.6. Hämosiderinhaltiges Bindegewebe.....	128
5.3. Laktoferrin.....	128
5.4. Schlussfolgerungen.....	130
6. Zusammenfassung.....	131
7. Summary.....	132
8. Literaturverzeichnis.....	135
9. Anhang.....	146
9.1. Lösungen, Puffer und Bezugsquellen.....	146
9.1.1. Lösungen und Puffer.....	146
9.1.2. Bezugsquellen.....	147
9.2. Tabellarische Erfassung aller Daten.....	150
9.2.1. Tabellarische Erfassung aller Daten der Fälle (Hunde mit Mammatumoren).....	150
9.2.2. Tabellarische Erfassung aller Daten der Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren).....	161
9.2.3. Tabellenschlüssel.....	170
9.2.4. Rasseschlüssel.....	172
9.3. Abkürzungsverzeichnis.....	173

1. Einleitung

Im Rahmen der Untersuchung von Mammatumoren des Hundes und deren oberflächlichen Leistenlymphknoten ist histologisch häufig die Speicherung von goldbraunem eisenhaltigem Pigment in den Makrophagen der Lymphknoten auffällig (s. Abbildung 1). Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass es sich bei dieser Art von Pigment um Hämosiderin handelt. Ein Ziel dieser Promotionsarbeit ist die spezifische Identifikation des eisenhaltigen goldbraunen Pigments. Weiterhin sollen mögliche, insbesondere hormonelle oder neoplastische, Ursachen der Pigmentspeicherung durch Auswertung gesammelter Informationen über die untersuchten Hunde in Verbindung mit Ergebnissen der histologischen Untersuchung hergeleitet werden. Mit Hilfe von Eisenfärbungen und immunhistologischen Untersuchungen soll geklärt werden, ob das eisenhaltige Protein Laktoferrin an einer Pigmentierung und Eisen-positiven Reaktion in Lymphknoten und Milchdrüse beteiligt sein kann. Zur Kontrolle soll auch auf Verbindungen mit zweiwertigem Eisen untersucht werden.

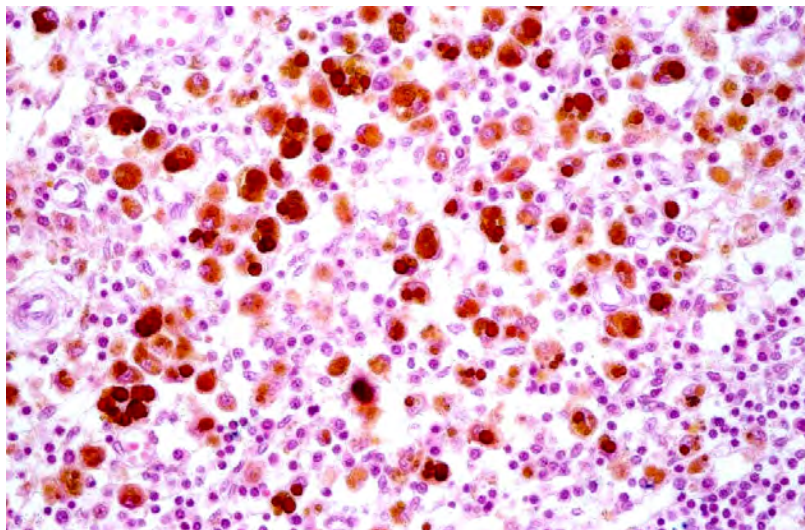


Abbildung 1: Hämosiderinhaltige Makrophagen im Marksinus eines caninen Lymphknotens. Obj. x 40. Hämatoxylin-Eosin.

2. Literaturübersicht

2.1. Eisenstoffwechsel

2.1.1. Ferritin

2.1.1.1. Vorkommen

Ferritin dient der intrazellulären Speicherung von dreiwertigem nicht-häm Eisen, die im Rahmen des Zellstoffwechsels auftritt (Crichton, 1975; Meguro et al., 2005). Typische Speicherzellen für Eisen sind Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS) von Knochenmark, Milz und Leber sowie die Hepatozyten (Mason und Taylor, 1978; Harrison und Arosio, 1996). Ferritin wurde außerdem u.a. im Epithel des Magens und Duodenums, in proximalen Tubuluszellen der Niere, im Zervixepithel des Uterus, in epithelialen und periacinären Zellen der Milchdrüse, in epithelialen Tumorzellen von Mammakarzinomen, in Kupffer-Zellen der Leber und in Histiozyten verschiedener Gewebe nachgewiesen (Mason und Taylor, 1978; Rossiello et al., 1984; Shterman et al., 1991). Ferritin konnte auch extrazellulär im Serum und in Körperflüssigkeiten wie Lymphe und Milch nachgewiesen werden (Leak, 1976; Harrison und Arosio, 1996).

2.1.1.2. Synthese

In Ferritin gespeichertes Eisen stammt von Hämoglobin aus dem Erythrozytenabbau, Transferrin und injizierten Eisenverbindungen (Rifkind, 1965; Andrews, 2005). Durch Bindung des Eisens an das zytosolische Protein Apoferritin entsteht Ferritin (Iancu und Shiloh, 1988). Dieses wird in Lysosomen (Siderosomen) transportiert und dort als Ferritin gespeichert oder durch lysosomale Proteolyse in Hämosiderin umgewandelt (Iancu und Shiloh, 1988; Meguro et al., 2005). Harrison und Arosio (1996) vermuten, dass extrazelluläres Ferritin aus geschädigten Zellen stammt oder aktiv sezerniert wurde. Für letzteres spricht auch die Beobachtung von Yuan et al. (2004), dass eisenhaltigen Makrophagen in vitro sowohl Eisen als auch Ferritin mittels Exozytose freisetzen.

2.1.1.3. Funktion

Eisen ist für die meisten Organismen, z.B. als Cofaktor für Enzyme, essentiell. Allerdings führt zweiwertiges Eisen in Anwesenheit von Sauerstoff zur Radikalbildung und kann somit die Zelle (DNS, Proteine, Membranlipide) schädigen. Dreiwertiges Eisen ist stabiler, aber bei neutralem pH-Wert unlöslich. Ferritin und auch Hämosiderin stellen eine Möglichkeit der Eisenspeicherung dar, die die Gefahr der Zellschädigung durch Radikale reduziert (Chiancone et al., 2004). Dies hat auch Bedeutung bei Entzündungen, da Eisen durch die Produktion von Radikalen die Entzündung verstärken und Leukozyten schädigen kann (Rodriguez et al., 1999). Zudem benötigen auch Mikroorganismen und neoplastische Zellen Eisen zum Zellwachstum. Dabei nutzen einige Bakterien das Eisen des Wirtes. Die Eisenspeicherung in Form von Ferritin und Hämosiderin verringert im Wirt das Bakterien und neoplastischen Zellen zur Verfügung stehende Eisen. Eisenüberschuss in bestimmten Geweben fördert Infektionen, Neoplasien, Kardiomyopathien, Arthropathien und das Voranschreiten endokriner und evtl. auch neurogener Degeneration (Weinberg, 1999; Chiancone et al. 2004). Green et al. (1988) konnten zeigen, dass an unlösliche Immunkomplexe gebundenes Ferritin die tumorizide Funktion von Makrophagen stärker hemmte als an unlösliche Immunkomplexe gebundenes Apoferritin. Dies beruhte wahrscheinlich auf frühzeitiger Freisetzung, verstärktem Verbrauch oder Hemmung von Effektormolekülen der Makrophagen. Bei Erkrankungen, z.B. Entzündungen, kommt es zur vermehrten Speicherung und verminderten Freisetzung von Eisen aus den Zellen des MPS. Dies führt zu verminderter Eisenkonzentration im Blut mit nachfolgender Anämie (Finch, 1975; Rodriguez et al., 1999). Alvarez-Hernandez et al. (1986) zeigten, dass peritoneale Makrophagen der Maus, die mit unspezifischen Entzündungsmediatoren stimuliert wurden, weniger Eisen freisetzten und eine geringere Ferritinsynthese zeigten als nicht stimulierte Makrophagen. Die Autoren vermuten, dass solche Makrophagen Eisen eher in unlöslicher Form als Hämosiderin oder in löslichen nicht-Ferritin Makromolekülen speichern. Extrazelluläres Ferritin dient vermutlich dem Eisenaustausch zwischen Zellen und der Regulation der Zellproliferation (Harrison und Arosio, 1996).

2.1.1.4. Abbau

Bei Eisenbedarf wird entweder weniger Ferritin in Siderosome aufgenommen oder es kommt zur gesteigerten Freisetzung von gespeichertem Eisen. Wahrscheinlich wird zuletzt aufgenommenes Eisen auch als erstes wieder freigesetzt (Iancu und Shiloh, 1994). Zur Eisenerfreisetzung aus Ferritin ist eine Reduktion des dreiwertigen Eisens zu zweiwertigem notwendig. Der genaue physiologische Mechanismus ist jedoch noch unbekannt (Meguro et al., 2005). Zudem scheint eine Sekretion von Ferritin mittels Exozytose möglich zu sein (Yuan et al., 2004).

Bei anhaltendem Eisenüberschuss wird Ferritin durch lysosomale Proteolyse in Siderosomen zu Hämosiderin umgewandelt (Meguro et al., 2005).

2.1.1.5. Nachweis

Ferritin kann eine diffuse Berliner Blau-positive Reaktion (s. Kapitel 2.2.1.) verursachen (Parmley, 1978; Richter, 1978; Pearse, 1985; Harrison und Arosio, 1996; Andrews, 2005). Andere Autoren dagegen geben an, dass Ferritin aufgrund seiner feinen Verteilung nicht mit der Berliner Blau-Reaktion nachweisbar ist (Lillie und Fullmer, 1976). Es gibt keine Angaben darüber, ob Ferritin in ungefärbten Schnitten pigmentiert erscheint.

2.1.2. Hämosiderin

2.1.2.1. Vorkommen

Hämosiderin dient, wie Ferritin, der intrazellulären Speicherung von dreiwertigem nicht-häm Eisen (Harrison und Arosio, 1996; Meguro et al., 2005). Aufgrund der Annahme, dass das gespeicherte Eisen aus dem Blut stammt, wurde der Name Hämosiderin etabliert (Neumann, 1888). Jedoch lässt sich weder morphologisch noch histochemisch unterscheiden, ob das Eisen aus Blutungen oder aus anorganischem Eisen, z.B. aus Fremdkörpern, stammt (Gedigk und Strauss, 1954). Hämosiderin ist die Hauptspeicherform für Eisen bei physiologischem und bei pathologischem (z.B. Phagozytose von Gewebetrümmern, Blutungen,

Erythrozytentransfusion, Eisenpeicherkrankheiten) Eisenüberschuss (Finch, 1975; Burkhardt, 1975; Meguro et al., 2005). Eine andere mögliche Ursache für die Hämosiderinbildung könnte auch Proteinmangel sein, der zu einer verminderten Bildung von Apoferritin mit vermehrter Eisenspeicherung in Hämosiderinkomplexen führt (Gedigk und Strauss, 1954; Iancu und Shiloh, 1994).

Hämosiderin konnte in Makrophagen verschiedener Organe (Lymphknoten, Thymus, Milz, Lunge, Dünndarm, Endometrium, Ovar) sowie in Kupffer-Zellen der Leber, in Hepatozyten, in Endothelzellen der Gefäße und in epithelialen Zellen von Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Marin-Padilla, 1977; Meguro et al., 2005).

Hämosiderinhaltige Makrophagen treten in Lymphknoten im Rahmen der physiologischen Erythrophagozytose, bei Hyperämien, Blutungen, Entzündungen, nach Eiseninjektionen im tributären Gebiet, nach Bluttransfusionen sowie bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems auf (Smith, 1958; Mills, 1989; Andrews, 2005; Fry und McGavin, 2007). Listinsky (1988) konnte in einem Großteil untersuchter Achsellymphknoten des Menschen geringgradige Erythrophagozytose durch Makrophagen mit Hämosiderinspeicherung feststellen, auch wenn kein Trauma (z.B. Biopsie) im tributären Gebiet des Lymphknotens und keine Hämolyse bekannt waren. Dumont et al. (1976) berichten von Hämosiderinspeicherung in Makrophagen der Lymphknoten von Tumorpatienten, unabhängig davon, ob die Lymphknoten histologisch nachweisbar in das Krankheitsgeschehen involviert waren oder nicht. Dies trat bei Patienten mit Lymphomen und Karzinomen, aber auch bei reaktiver Hyperplasie auf. Viele Veröffentlichungen beschreiben die Anwesenheit von hämosiderinbeladenen Makrophagen in menschlichen benignen und malignen Mammatumoren (Iancu, 1989b; Choi et al., 2006; Reid-Nicholson et al., 2006). Marin-Padilla (1977) beschreibt einen Fall von Erythrophagozytose durch epitheliale Zellen eines menschlichen Mammakarzinoms. Dabei konnten phagozytierte Erythrozyten und Hämosiderin auch in den Zellen der Metastasen, v.a. im betroffenen Lymphknoten, gefunden werden. Dies war immer in den Fällen zu beobachten, in denen auch intratumorale Blutungen und hämosiderinbeladene stromale Makrophagen auftraten. Freitas et al. (2007) vermuten, dass eine verstärkte

Hämosiderose in Mammatumoren von Mäusen eine erhöhte Eisenverfügbarkeit für die Tumorzellen auf Kosten des gesunden Gewebes zur Folge hat.

Valli (2007 und 2008) vermutet, dass Hämosiderin bei Eisenüberschuss auch an Bindegewebe gebunden auftreten kann (s. Abbildung 2). Dafür spräche eine Berliner Blau-positive Reaktion des Bindegewebes, die nicht auf kleinere Moleküle wie Transferrine zurückzuführen sei. An welche Anteile des Bindegewebes das Hämosiderin gebunden ist, wird nicht angegeben.

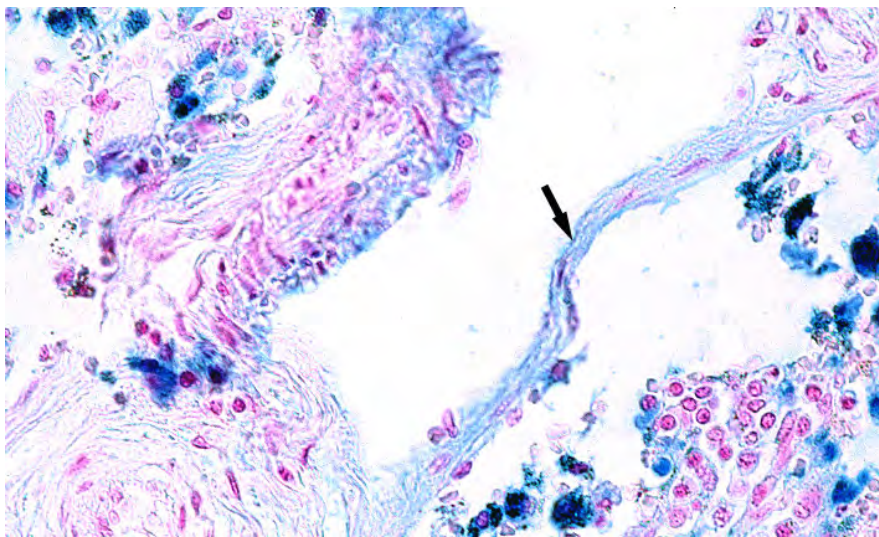


Abbildung 2: Hämosiderinhaltiges Bindegewebe (Pfeil) der Trabekel eines caninen Lymphknotens der eigenen Untersuchung. Die Berliner Blau-positive Reaktion des Bindegewebes der Trabekel erschien in der eigenen Untersuchung immer diffus und extrazellulär. Obj. x 40. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

Als Hämosiderose wird eine Eisenspeicherung in Geweben ohne funktionelle Beeinträchtigung bezeichnet. Dagegen kommt es bei der Hämochromatose zur Zellschädigung durch das gespeicherte Eisen (Iancu, 1989a). In der Regel verursacht die Speicherung von Hämosiderin in Zellen des MPS keinen Gewebeschaden, anders als bei der Speicherung in Parenchymen (Finch, 1975; Iancu, 1989a).

2.1.2.2. Synthese

Hämosiderin besteht aus Eisen, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden (Gedigk und Strauss, 1954). Es kann durch lysosomale Proteolyse von Ferritin in Siderosomen, aber vermutlich auch unabhängig von Ferritin gebildet werden (Meguro et al., 2005). Die ferritinunabhängige Bildung tritt wahrscheinlich bei sehr hohen Eisen-Serumspiegeln auf, wenn das Eisen nicht an Transferrin gebunden ist (Crichton und Ward, 1992). Die molekulare Zusammensetzung von Hämosiderin kann variieren, was vermutlich mit der molekularen Zusammensetzung des ursprünglichen eisentragenden Moleküls und mit der Kondensation mit anderen lysosomalen Produkten zusammenhängt (Richter, 1978). Hämosiderin ist im Gegensatz zu Ferritin wasserunlöslich (Richter, 1978; Harrison und Arosio, 1996).

Bei retinalen Blutungen bei Rhesus Affen ließ sich Hämosiderin, falls es gebildet wurde, nicht früher als 2 Tage nach Blutungsbeginn nachweisen (Gilliland et al., 2005). Auch in Wunden der menschlichen Haut trat Hämosiderin erst 2 - 3 Tage nach dem Trauma auf (Betz, 1994). Bei subkutaner Injektion von Blut bei verschiedenen Spezies ließ sich Hämosiderin im Gewebe schon 24 Stunden nach der Injektion nachweisen (Pearse, 1985). Eine postmortale Bildung von Hämosiderin konnte nicht nachgewiesen werden (Betz, 1994).

Burkhardt (1975) beobachtete einen Anstieg des Hämosideringehaltes im Knochenmark mit dem Alter. Zudem stellte er bei Männern einen höheren Hämosideringehalt im Knochenmark fest als bei Frauen. In der Milz von Ratten konnte eine Steigerung der Funktion der Zellen des MPS durch die Östrogenderivate Diethylstilboestrol und Diethylstilboestroldiphosphat festgestellt werden. Dazu gehörte u.a. eine gesteigerte Phagozytose mit verstärkter Ablagerung von Hämosiderin (Steven und Snook, 1975).

Bei Ratten mit Eisenüberschuss konnte gezeigt werden, dass v.a. Makrophagen in der Milz und in den Lymphknoten mehr Hämosiderin enthielten als Makrophagen von Ratten mit normalem Eisenstatus. Dabei nahm bei den Ratten mit Eisenüberschuss nicht nur die Intensität der Eisen-positiven Reaktion zu, sondern auch die Anzahl der eisenhaltigen Makrophagen. Zudem zeigten auch die Kupffer-Zellen, die Hepatozyten und die sinusoidalen Endothelzellen der Leber der Ratten mit

Eisenüberschuss eine stärkere Eisen-positive Reaktion. Diese stärkere Eisen-positive Reaktion war auf eine Zunahme der Anzahl an Siderosomen zurückzuführen (Meguro et al., 2005).

2.1.2.3. Funktion

Hämosiderin hat als eisenspeicherndes Molekül die selben Funktionen wie Ferritin (s. Kapitel 2.1.1.3.). Hämosiderin kann im Gegensatz zu Ferritin große Mengen an Eisen speichern und somit bei Eisenüberschuss den Zelltod verhindern (Iancu, 1989a). Allerdings ist die Menge an speicherbarem Eisen begrenzt. So kommt es bei langanhaltendem Eisenüberschuss zur Zellschädigung bis hin zum Zelltod. Dies könnte auf eine Verdrängung der Zellorganellen durch Siderosome, eine Erschöpfung der Apoferritinbildung oder auf eine Schädigung der Lysosomen mit anschließender Freisetzung ihres Inhaltes zurückzuführen sein (Trump et al., 1975; Iancu, 1989a).

2.1.2.4. Abbau

Gespeichertes Eisen wird aus Hämosiderin im Gegensatz zu Ferritin kaum freigesetzt (Andrews, 2005). Meguro et al. (2005) vermuten, dass zur Eisenfreisetzung aus Hämosiderin, wie bei Ferritin, eine Reduktion des Eisens notwendig ist, da dreiwertiges Eisen bei physiologischem pH-Wert im Gegensatz zum zweiwertigen Eisen unlöslich ist. Dafür spräche zum einen der saure lysosomale pH-Wert, der eine Reduktion erleichtert. Zum anderen konnten die Autoren zweiwertiges Eisen v.a. am Rand von Hämosiderinablagerungen, dort wo eine Mobilisierung von Eisen vermutlich stattfindet, nachweisen (Meguro et al., 2005). Der nach der Eisenfreisetzung verbleibende Anteil wird als Aposiderin bezeichnet (Richter, 1978). Wie lange Hämosiderin in Zellen nach der Bildung nachweisbar ist, ist nicht vorhersagbar und variiert stark (Gilliland et al., 2005).

2.1.2.5. Nachweis

Histologisch stellt sich Hämosiderin als scholliges oder körniges Pigment von goldgelber bis dunkelbrauner Farbe dar (Goessner, 1953; s. Abbildung 9, Kapitel 4.2.1.1.). Nach Herauslösung des Eisens durch Säure erscheint das entstandene Aposiderin braun (Lillie 1965) oder farblos (Goessner, 1953). Hämosiderin lässt sich durch die Berliner Blau-Reaktion (s. Kapitel 2.2.1. sowie Abbildung 3) nachweisen (Gömöri, 1936).

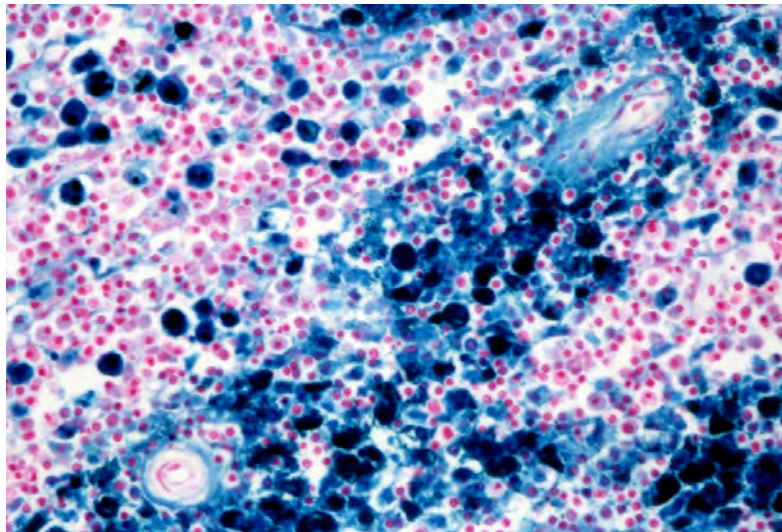


Abbildung 3: Hämosiderinhaltige Makrophagen im Marksinus eines caninen Lymphknotens. Obj. x 40. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

2.1.3. Laktoferrin

2.1.3.1. Vorkommen

Laktotransferrin (Laktotransferrin) gehört zu den Transferrinen und wurde erstmals 1939 in boviner Milch entdeckt. Ein Molekül Laktoferrin kann zwei Eisenionen binden und somit in verschieden gesättigten Formen vorliegen. Es treten auch verschiedene Isoformen mit den selben physikalischen, chemischen und antigenetischen Eigenschaften, aber unterschiedlichen Funktionen auf (Levay und Viljoen, 1995).

Laktoferrin ließ sich u.a. in Kolostrum, Milch, Tränenflüssigkeit, Speichel, Nasen- und tracheobronchialen Sekret, Galle, Pankreassaft, Seminalplasma, Urin, Synovialflüssigkeit, odontogenen Zysten, Blutplasma, Lymphe, Makrophagen (u.a. in Lymphknoten), neutrophilen Granulozyten, auf Lymphozyten, in Belegzellen der Magendrösen, Epithel-Zellen des Duodenums, myeloiden Zellen des Knochenmarks, Drüsenepithelien des Uterus, Drüsenepithelien der Bronchien, Acinuszellen normaler und dysplastischer Milchdrüse, epithelialen Zellen von Adenomen der Milchdrüse, neoplastischen Zellen von Mammakarzinomen, im Sekret der Milchdrüse und in proximalen Tubulusepithelzellen der Niere nachweisen (Mason und Taylor, 1978; Kontinen und Reitamo, 1979; Rossiello et al., 1984; Siebein, 1991; Levay und Viljoen, 1995; Pakkanen und Aalto, 1997; Kitagawa et al., 2003; Kikuchi et al., 2003; Takeuchi et al., 2004). Ältere Untersuchungen konnten kein Laktoferrin in der Milch des Hundes nachweisen (Masson und Heremans, 1971). Neuere Untersuchungen an caniner Milchdrüse zeigten Laktoferrin im Sekret der unveränderten Milchdrüse, in neoplastischen Zellen eines Adenoms und eines Adenokarzinoms, in Corpora amylacea des Adenokarzinoms sowie im Amyloid neoplastischer Acini beider Tumorarten (Taniyama et al., 2000).

2.1.3.2. Synthese

Laktoferrin wird in neutrophilen Granulozyten produziert und als eisenfreies Apolaktoferrin in spezifischen Granula gespeichert. Aus diesen kann es entweder in das Blut oder in das umliegende Gewebe sezerniert werden oder die Granula fusionieren mit Phagosomen. Die Sekretion in den Kreislauf ist von verschiedenen Degranulationsfaktoren abhängig (Levay und Viljoen, 1995).

Levay und Viljoen (1995) berichten, dass die Laktoferrinkonzentration im Kolostrum wesentlich höher als im Blutplasma ist, die Konzentration an neutrophilen Granulozyten aber geringer. Die Autoren gehen somit davon aus, dass Laktoferrin auch in Zellen der Milchdrüse gebildet oder entgegen des Konzentrationsgradienten aktiv transportiert wird. Griesbeck-Zilch et al. (2008) konnten zeigen, dass bovine Epithelzellen der Milchdrüse in vitro Laktoferrin bilden. Es konnten Antikörper

entwickelt werden, die unterschiedlich mit Laktoferrin aus Milch und solchem aus neutrophilen Granulozyten reagierten. Dies könnte aber auch auf verschiedenen eisengesättigte Laktoferrine zurückzuführen sein (Levay und Viljoen, 1995).

Beim Menschen konnte nachgewiesen werden, dass Laktoferrin aus der Muttermilch unverändert aus dem neonatalen Darm aufgenommen wird (Levay und Viljoen, 1995). Auch bei heranwachsenden Schweinen und adulten Ratten konnte gezeigt werden, dass bovines Laktoferrin aus dem Darm resorbiert wird. Dabei ließ sich das bovine Laktoferrin auch auf Lymphozyten und in Makrophagen der Mukosa und der Lymphe (Schwein) bzw. in Makrophagen der Mesenteriallymphknoten (Ratte) nachweisen (Kitagawa et al., 2003; Takeuchi et al., 2004).

Die Laktoferrinkonzentration im Blutplasma des Menschen steigt bei Eisenüberladung, Entzündung, Infektion und während einer Tumorentwicklung an (Levay und Viljoen, 1995). Viele Autoren beschreiben einen Zusammenhang zwischen der Laktoferrinbildung und dem Endokrinium (Green und Pastewka, 1978; Teng et al., 1989; Levay und Viljoen, 1995; Kikuchi et al., 2003).

2.1.3.3. Funktion

Laktoferrinrezeptoren wurden auf Enterozyten, Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, Hepatozyten und einigen Bakterien gefunden (Pakkanen und Aalto, 1997; Suzuki und Lonnerdal, 2002). Allgemein kann Laktoferrin an viele Zellen, Proteine und DNS, auch unspezifisch, binden. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass sich Laktoferrin aus der Milch und Laktoferrin aus neutrophilen Granulozyten in der Region unterscheiden, die zur Bindung an Makrophagen dient (Levay und Viljoen, 1995).

Laktoferrin zählt zu den Akute-Phase Proteinen, es wirkt antithrombotisch, hat antimikrobielle Aktivitäten und Einfluss auf den Zellzyklus. Außerdem hat es Bedeutung bei der Eisenaufnahme aus dem Darm, der Aktivierung von Phagozyten, der Immunantwort, der Tumorentwicklung und bei der Regulation der Myelopoese (Levay und Viljoen, 1995; Pakkanen und Aalto, 1997; Ward und Conneely, 2004).

Bakteriostatische Effekte werden zum einen durch Bindung des für Bakterien notwendigen Eisens erzielt, zum anderen gibt es weitere eisenunabhängige antimikrobielle Effekte (Pakkanen und Aalto, 1997). Im Rahmen von Entzündungen und Tumoren kommt es zur vermehrten Freisetzung von Apolaktoferrin aus neutrophilen Granulozyten und zur verstärkten Phagozytose von eisenhaltigem Laktoferrin durch Makrophagen (Weinberg, 1999). Somit verringert sich die eisenvermittelte Radikalbildung und es steht weniger Eisen für Mikroorganismen und neoplastische Zellen zur Verfügung (s. Kapitel 2.1.1.3.). Es gibt unterschiedliche Angaben darüber, ob Laktoferrin das Zellwachstum fördert oder hemmt. Nachgewiesen wurde, dass es DNS bindet und die Transkription aktiviert (Pakkanen und Aalto, 1997). Von anderer Seite wird ein Produkt des alternativen Spleißens, delta-Laktoferrin, für die Hemmung des Zellzyklus verantwortlich gemacht. Delta-Laktoferrin findet sich in gesunden Geweben und soll in den entsprechenden maligne entarteten Geweben fehlen (Breton et al., 2004). Yamada et al. (2008) konnten zeigen, dass bovines Laktoferrin in vitro das Wachstum caniner Adenokarzinomzellen der Milchdrüse stärker hemmt als das Wachstum normaler caniner Fibroblasten.

2.1.3.4. Abbau

Aus dem Kreislauf und dem Interstitium wird Laktoferrin wahrscheinlich über rezeptorvermittelte Endozytose in Zellen des MPS aufgenommen. Anschließend wird das Eisen in Form von Ferritin gespeichert. Möglicherweise wird Laktoferrin auch in Kupffer-Zellen, Endothelzellen der Leber und Hepatozyten aufgenommen (Levay und Viljoen, 1995).

Birgens (1994) stellte folgende Hypothese zum Laktoferrinstoffwechsel auf: Bei Neutrophilie, z.B. aufgrund von Entzündungen, wird vermehrt Apolaktoferrin aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt. Dieses bindet, noch eisenfrei, an Rezeptoren der Monozyten- bzw. Makrophagenmembran. Von dort aus bindet es Eisen und verhindert so den Eisentransfer aus den Makrophagen zu Transferrin. Somit ist

Laktoferrin an der Hyposiderinämie bei Entzündungen beteiligt. Eisenhaltiges Laktoferrin wird wahrscheinlich in saure Lysosomen aufgenommen, deren niedriger pH-Wert die Eisenfreisetzung erleichtert. Anschließend wird das Laktoferrin, jetzt ohne Affinität zum Makrophagenrezeptor, wieder freigesetzt.

2.1.3.5. Nachweis

In der Milch erscheint Laktoferrin lachsfarben. Laktoferrin in Granula neutrophiler Granulozyten lässt sich nach Sättigung mit Eisen durch die Berliner Blau-Reaktion (s. Kapitel 2.2.1.) nachweisen (Siebein, 1991). Bei verschiedenen Spezies wurde Laktoferrin bereits immunhistologisch nachgewiesen (Kontinen und Reitamo, 1979; Kitagawa et al., 2003; Takeuchi et al., 2004). Auch beim Hund konnte Laktoferrin immunhistologisch mittels Antikörper gegen humanes und gegen equines Laktoferrin nachgewiesen (Siebein, 1991; Taniyama et al., 2000; Kikuchi et al., 2003) werden.

2.2. Histologische Eisenfärbungen

Bei allen Eisenfärbungen ist zu beachten, dass bei der Gewebebehandlung eine Oxidation von zweiwertigem zu dreiwertigem Eisen möglich ist. Ebenso ist eine Reduktion von dreiwertigem zu zweiwertigem Eisen durch Reduktoren im Gewebe möglich. Bisher konnten zumindest in Milzmakrophagen und Kupffer-Zellen der Leber keine Gewebereduktoren nachgewiesen werden (Meguro et al., 2005).

2.2.1. Berliner Blau-Reaktion

Hämosiderin enthält wie auch Laktoferrin, Ferritin und Transferrin dreiwertiges Eisen (Ferri-Ion; Crichton, 1975; Siebein, 1991). Histochemisch lässt sich dreiwertiges Eisen, sofern es lose gebunden ist, durch die Berliner Blau-Reaktion nach Perls (Perls reaction, Prussian blue) nachweisen. Dabei wird das Eisen durch Salzsäure gelöst und bildet Eisenchlorid. Dieses reagiert mit Ferrocyanid zu einem blauen Präzipitat (Gömöri, 1936). Da sich Eisen auch durch saure Fixantien aus der

Proteinbindung lösen lässt, ist es wichtig, neutrale Fixantien zu verwenden (Pearse, 1985).

Ob Eisen durch die Berliner Blau-Reaktion dargestellt werden kann, hängt davon ab, wie stark das Eisen im Protein gebunden ist. Lose gebundenes Eisen, z.B. in Hämosiderin, ist mittels Berliner Blau-Reaktion nachweisbar (Gömöri, 1936; s. Abbildung 10, Kapitel 4.2.1.1.). Auch eisenhaltiges Laktoferrin lässt sich mit der Berliner Blau-Reaktion anfärben (Siebein, 1991). Einige Autoren beschreiben, dass auch Ferritin eine diffuse Berliner Blau-Reaktion verursachen kann (Parmley, 1978; Richter, 1978; Harrison und Arosio, 1996; Andrews, 2005). Andere Autoren dagegen geben an, dass Ferritin aufgrund seiner feinen Verteilung nicht mit der Berliner Blau-Reaktion nachweisbar ist (Lillie und Fullmer, 1976). Valli (2007 und 2008) beschreibt eine Berliner Blau-positive Reaktion des Bindegewebes (s. Abbildung 11, Kapitel 4.2.1.1.) und führt diese auf gebundenes Hämosiderin zurück.

2.2.2. Turnbolls Blau-Reaktion

Zweiwertiges Eisen (Ferro-Ion) kommt u.a. in Hämoglobin und Myoglobin vor (Crichton, 1975). Es ist durch die Turnbolls Blau-Reaktion (direct Turnbull's blue reaction, Turnbull blue method of Tirmann and Schmelzer) nachweisbar, sofern es sich nicht um fest gebundenes Eisen, wie z.B. in Hämoglobin, handelt (Romeis, 1989). Bei der Turnbolls Blau-Reaktion wird das Eisen durch Salzsäure gelöst und bildet mit Ferricyanid einen blauen Niederschlag (Gömöri, 1936).

Mit der Turnbolls Blau-Reaktion nachweisbares, zweiwertiges Eisen tritt im Körper selten auf (Pearse, 1985; Romeis, 1989). Gömöri (1936) konnte in histologischen Schnitten, u.a. von Hämatomen, lichtmikroskopisch kein zweiwertiges Eisen mittels Turnbolls Blau-Reaktion nachweisen. Lillie und Fullmer (1976) beschreiben gelegentliche positive Turnbolls Blau-Reaktionen im Bereich der Eisenabsorption im Duodenum und im Jejunum, in Corpora hämorrhagica des Ovars, in Eisen- und Calciuminkrustationen nekrotischer Gefäße und bei cäcaler Enterosidose der

Meerschweinchen. Letztere ist durch vermehrtes Auftreten von Berliner Blau-positiven, pigmenthaltigen Makrophagen in der Lamina propria des Cäcums gekennzeichnet (Takahashi et al., 1988). Parmley (1978) und Meguro et al. (2005) konnten bei Ratten positive Turnbells Blau-Reaktionen in Makrophagen verschiedener Gewebe zeigen. Die von Lillie und Fullmer (1976), Parmley (1978) sowie Meguro et al. (2005) beschriebenen positiven Turnbells Blau-Reaktionen traten jedoch nur im Bereich Berliner Blau-positiver Reaktionen auf.

2.2.3. Quinckes-Reaktion

Die Quinckes-Reaktion (iron sulphide reaction) dient dem gleichzeitigen Nachweis von drei- und zweiwertigem Eisen. Sie besteht aus einer Reduktionsreaktion, bei der drei- und zweiwertiges Eisen mit Hilfe von Ammoniumpolysulfid in Eisensulfid, welches zweiwertiges Eisen enthält, umgewandelt wird. Anschließend wird das Eisensulfid mit der Turnbells Blau-Reaktion in Turnbells Blau umgewandelt (Gömöri, 1936). Die Reduktionsreaktion der Quinckes-Reaktion wurde in den eigenen Untersuchungen zur Herstellung von Positiv-Kontrollen für die Turnbells Blau-Reaktion aus Schnitten mit dreiwertigem Eisen (Hämosiderin) angewendet.

2.2.4. Intrazelluläres, Berliner Blau-negatives, braunes Pigment

Zu den intrazellulären, Berliner Blau-negativen, braunen Pigmenten (**BBn-Pigmenten**) gehören Aposiderin, Lipopigmente und Melanin (Pearse, 1985).

2.2.4.1. Aposiderin

Aposiderin erscheint braun oder farblos. Es entsteht durch Herauslösung des Eisens aus Hämosiderin, z.B. intravital oder durch saure Fixantien (Goessner, 1953; Lillie, 1965; Pearse, 1985).

Aposiderin zeigt gelegentlich Autofluoreszenz und ist in der Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion negativ (Gedigk und Strauss, 1954; Pearse 1985).

Nach eigenen Untersuchungen (s. Kapitel 4.2.2.2.) ist Aposiderin mit Kaliumpermanganat nicht bleichbar und in der Long Ziehl-Neelsen-Reaktion (Säurefestigkeit) negativ (s. Tabelle 1, Kapitel 2.2.4.3.).

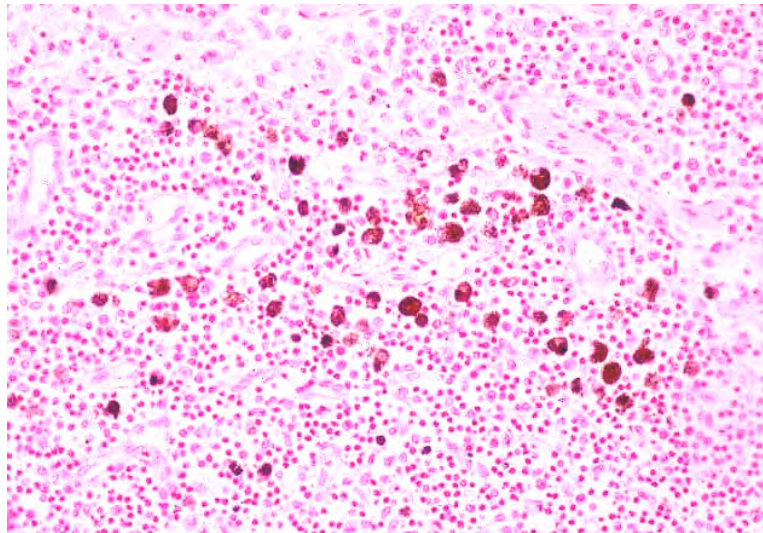


Abbildung 4: BBn-Pigment in Makrophagen des Marksinus eines caninen Lymphknotens. Obj. x 20. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

2.2.4.2. Lipopigmente

Zu den Lipopigmenten gehören u.a. Lipofusazine, Ceroid, Hämfuszin und Lipochrome. Die meisten Lipopigmente erscheinen mit zunehmendem Oxidationsgrad gelber oder gelb-brauner (Pearse, 1985). Lipofuszin, auch als Alterspigment bezeichnet, akkumuliert intrazellulär im Rahmen der Zellalterung (Porta, 2002).

In seltenen Fällen können Lipopigmente auch Eisen enthalten. In diesen Fällen zeigt jedoch meist nur ein Teil des Pigments eine Eisen-positiven Reaktion (Pearse, 1985; Lee et al. 1998). Im fortgeschrittenem Oxidationszustand zeigen Lipofusazine Autofluoreszenz (Pearse, 1985). Über diese Autofluoreszenz gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Ältere Veröffentlichungen berichten von einer gelben Autofluoreszenz bei einer Anregung von ca. 360 nm (Dayan et al. 1988;

Harmann, 1989). Neuere Veröffentlichungen berichten von einer gelben bis orangefarbenen Autofluoreszenz bei einer Anregung von ca. 440 - 490 nm (Gao et al., 1994; Porta, 2002; Kellner et al., 2008). Schnell et al. (1999) sowie Brunk und Terman (2002) konnten bei verschiedenen Anregungswellenlängen ein weites Emissionsspektrum (blau, gelb, grün, rot, dunkelrot) von Lipofuszin (ca. 330 - 390 nm, 450 - 490 nm, 510 - 560 nm, 610 - 640 nm) nachweisen. Die unterschiedlichen Anregungswellenlängen und Emissionsspektren für Lipofuszin sind von der molekularen Zusammensetzung (Fluorophoren) der Lipofuszin abhängig (Brunk und Terman, 2002). Gao et al. (2002) konnten eine Veränderung des Emissionsspektrums von Lipofuszin durch Alterung des Pigments und durch eine Gewebefixierung in Formalin zeigen. In eigenen Untersuchungen konnte keine Autofluoreszenz von Lipofuszin (Kleinhirn eines 17 Jahre alten Warmblut-Wallachs mit altersbedingter Lipofuszinablagerung in den Purkinje-Zellen [Tagebuchnummer S835/08]) bei einer Anregung im ultravioletten Bereich gezeigt werden. Dagegen zeigte sich eine deutliche gelbe Autofluoreszenz bei einer Anregung von 450 - 490 nm.

Mit zunehmenden Oxidationsgrad reagieren Lipofuszin in der Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion positiv. Nur in seltenen Fällen ist diese Reaktion bei stark oxidierten Lipofuszin negativ. Ein Teil der Lipofuszin ist bleichbar. Die meisten Lipofuszin reagieren in der Long Ziehl-Neelsen-Reaktion positiv (Rotfärbung). Diese positive Reaktion ist mit zunehmender Braunfärbung der Lipofuszin schwieriger zu erkennen (Pearse, 1985; s. Abbildung 5, nächste Seite sowie Tabelle 1, Kapitel 2.2.4.3.).

	Frühe Lipofusazine - Mittelalte Lipofusazine - Alte Lipofusazine
Oxidationsgrad	ansteigend
Pigmentation	in der Regel ansteigend von hellgelb zu dunkelbraun
Autofluoreszenz	-----+++++++-----
Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion	-----+++++++((++))
Long Ziehl-Neelsen-Reaktion	-----+++++++-----

-. negativ; +: positiv; (++) : meist positiv.

Abbildung 5: Ausgewählte Eigenschaften der Lipofusazine in Abhängigkeit ihres Oxidationsgrades nach Pearse (1985).

Pearse (1985) beschreibt Lipofusazine in Makrophagen in geringgradig oxidiertem Zustand als gelbes bis braunes, nicht bleichbares Pigment mit gelber Autofluoreszenz, schwach positiver Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion und schwach positiver Long Ziehl-Neelsen-Reaktion.

2.2.4.3. Melanin

Melanin erscheint braun bis schwarz. Es zeigt keine Autofluoreszenz und ist in der Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion positiv. Melanin ist bleichbar und kann in der Long Ziehl-Neelsen-Reaktion positiv reagieren (Pearse, 1985; Romeis, 1989; s. Tabelle 1, nächste Seite).

Tabelle 1: Ausgewählte Eigenschaften von BBn-Pigmenten

	Aposiderin	Lipofusazine	Melanin
Autofluoreszenz	- / (+)	- / +	-
Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion	-	(-) / +	+
Bleichbarkeit mit Kaliumpermanganat (-: nicht bleichbar; +: bleichbar)	-	- / +	+
Long Ziehl-Neelsen-Reaktion	-	(-) / +	- / +

-: negativ; (-): selten negativ; +: positiv; (+): selten positiv

2.3. Untersuchte canine Lymphknoten

In der vorliegenden Untersuchung wurden canine Kehlgangslymphknoten, Achsellymphknoten, mittlere Darmbeinlymphknoten und oberflächliche Leistenlymphknoten untersucht. Abbildung 6 zeigt die tributären Gebiete und lymphatischen Verbindungen dieser Lymphknoten nach Patsikas und Dessiris (1996a und b), Pereira et al. (2003) sowie Nickel et al. (2005).

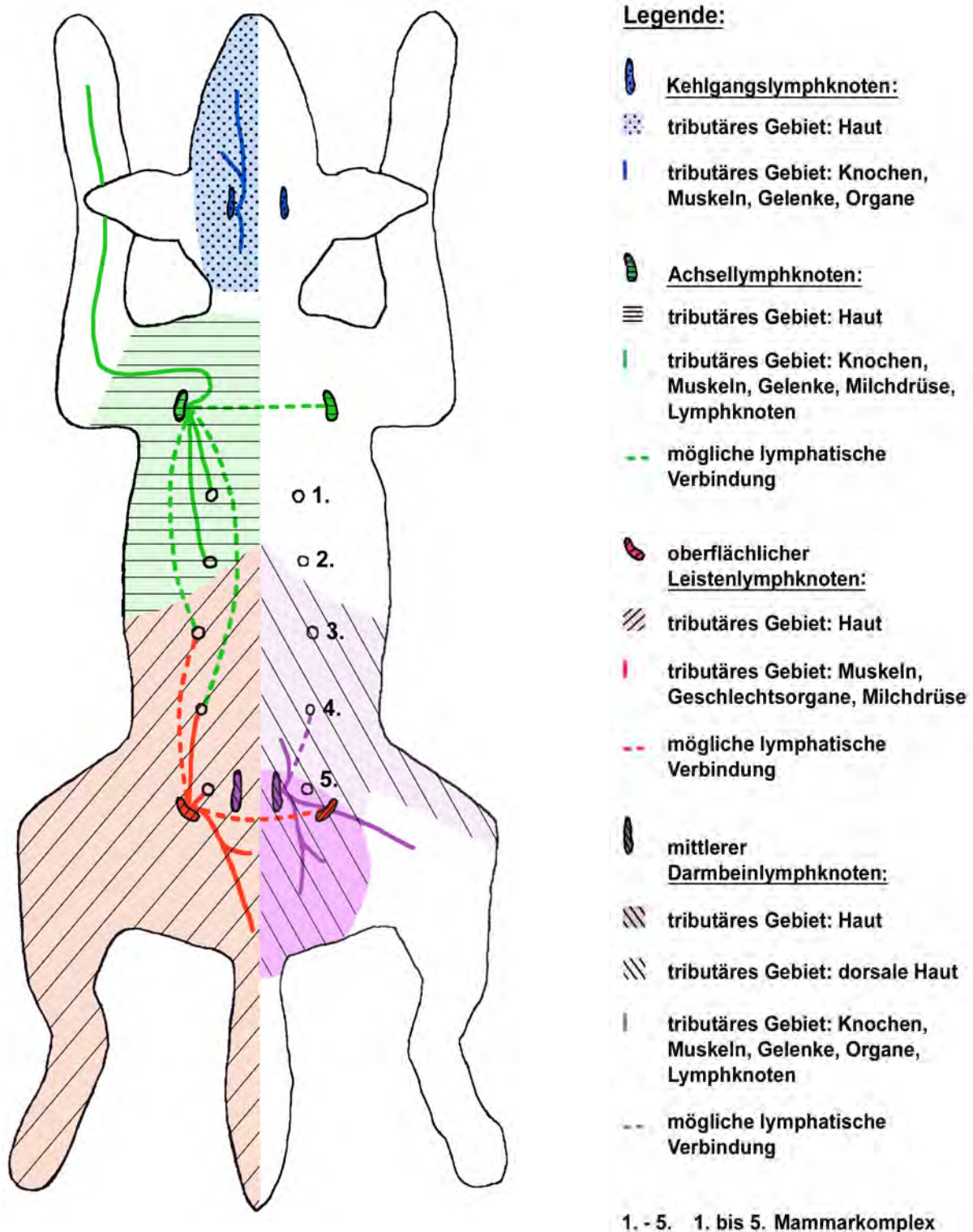


Abbildung 6: Untersuchte Lymphknoten, ihre tributären Gebiete und lymphatischen Verbindungen nach Patsikas und Dessiris (1996a und b), Pereira et al. (2003) und Nickel et al. (2005).

2.4. Milchdrüse

2.4.1. Lymphdrainage

Die lymphatische Versorgung der caninen Milchdrüse ist in Tabelle 2 nach den Angaben von Patsikas und Dessiris (1996a und b) sowie Pereira et al. (2003) dargestellt. Patsikas und Dessiris (1996a) konnten keine lymphatischen Anastomosen ipsilateraler oder kontralateraler Mammarkomplexe nachweisen. Allerdings beschreiben sie einen retrograden Lymphfluss aus den regionalen Lymphknoten in andere Mammarkomplexe, als die, von denen die Lymphe ursprünglich kam.

Tabelle 2: Lymphatischen Versorgung caniner Mammarkomplexe

Ipsilateraler Lymphknoten/ Lymphzentrum	Mammarkomplex				
	1.	2.	3.	4.	5.
Achsellymphknoten	+	+	<>	(+)	-
Oberflächlicher Halslymphknoten	(+)	-	-	-	-
Ventrale thorakale Lymphknoten	(+)	-	-	-	-
Oberflächlicher Leisten- lymphknoten	-	-	<>	+	+
Mittlerer Darmbein- lymphknoten	-	-	-	(+)	-
Kniekehllymphknoten	-	-	-	(+)	(+)

+ : lymphatische Verbindung zwischen Lymphknoten und Mammarkomplex; <> : lymphatische Verbindung des Achsellymphknotens und/oder des oberflächlichen Leistenlymphknotens mit dem Mammarkomplex; (+) : gelegentlich zusätzlich auftretende lymphatische Verbindung zwischen Lymphknoten und Mammarkomplex; - : keine lymphatische Verbindung

2.4.2. Mammatumoren

Die Mammatumoren des Hundes lassen sich nach der World Health Organization-Klassifikation folgendermaßen einteilen (aufgeführt werden nur die im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchten Tumoren):

Bösartige Tumoren:

- Komplexes Karzinom
- Einfaches Karzinom
 - Tubulopapilläres Karzinom
 - Solides Karzinom
 - Anaplastisches Karzinom
- Karzinom in benignem Misch tumor
(maligner Misch tumor)

Gutartige Tumoren:

- Adenome
 - Einfaches Adenom
 - Komplexes Adenom
- Fibroadenom
- Benigner Misch tumor

Komplexe Karzinome bestehen aus neoplastischen luminalen epithelialen und myoepithelialen Zellen.

Einfache Karzinome zeichnen sich durch neoplastisches Wachstum der luminalen epithelialen oder myoepithelialen Zellen aus. Anhand der Wachstumsform wird zwischen tubulopapillären Karzinomen mit tubulärem und/oder papillärem, gelegentlich papillär-zystischem Wachstum und soliden Karzinomen unterschieden.

Anaplastische Karzinome zeigen pleomorphe Zellen, die keiner anderen Karzinomart zugeordnet werden können.

Karzinome in benignen Misch tumoren (maligne Misch tumoren) enthalten maligne epitheliale Zellen in benignen Misch tumoren.

Einfache Adenome bestehen aus gut differenzierten luminalen epithelialen oder myoepithelialen Zellen.

Komplexe Adenome bestehen aus gut differenzierten luminalen epithelialen und myoepithelialen Zellen.

Fibroadenome bestehen aus luminalen epithelialen Zellen und Stromazellen, gelegentlich auch myoepithelialen Zellen.

Benigne Mischtumoren bestehen aus luminalen epithelialen und/oder myoepithelialen Zellen und mesenchymalen Zellen (Hampe und Misdorp, 1974; Misdorp et al., 1999).

3. Material und Methoden

3.1. Material

Das Material stammte aus dem Untersuchungsgut des Instituts für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen. Es setzte sich aus eingesandten Geweben von Hunden mit Mammatumoren und aus Geweben von zur Sektion eingesandten Hunden zusammen. Zudem wurden zu allen Hunden ergänzende Daten erhoben.

3.1.1. Hunde mit Mammatumoren (Fälle)

Von 100 Hunden mit Mammatumoren wurden folgende Gewebe untersucht:

- Linker oder rechter oberflächlicher Leistenlymphknoten
- Zugehörige(r) Mammatumor(en)
- Zugehöriges unverändertes Milchdrüsengewebe

Es lagen keine weiteren Gewebe dieser Hunde zur Untersuchung vor. Zum Teil wurden pro Hund bis zu 6 Mammatumoren eingesandt und untersucht. Alle Mammatumoren traten nur im 3. - 5. Mammarkomplex auf, d.h. im Einzugsgebiet der oberflächlichen Leistenlymphknoten. Unverändertes Milchdrüsengewebe wurde untersucht, um die Eisenspeicherung in diesen Geweben mit der Eisenspeicherung in den Mammatumoren vergleichen zu können.

3.1.2. Zur Sektion eingesandte Hunde (Kontrollen)

Von 100 zur Sektion eingesandten Hunden wurden folgende Gewebe untersucht:

- Linker und/oder rechter oberflächlicher Leistenlymphknoten
- Linker und/oder rechter mittlerer Darmbeinlymphknoten
- Linker und/oder rechter Achsellymphknoten
- Linker und/oder rechter Kehlganglymphknoten
- Milz

Bei keinem dieser Hunde konnten in der Sektion Mammatumoren gefunden werden, auch im Vorbericht gab es keine Hinweise auf bereits entfernte Mammatumoren. Zudem zeigte keiner der untersuchten Lymphknoten Metastasen von Mammatumoren. Aus nicht selbst beeinflussbaren Gründen konnten nicht für alle Hunde der Kontrollen die Lymphknoten beider Körperseiten untersucht werden.

3.1.3. Daten über untersuchte Hunde

Für die Fälle und Kontrollen wurden aus den Unterlagen des Instituts für Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen, und von den einsendenden Tierärzten und Tierbesitzern mittels Fragebogen Daten über die untersuchten Hunde erhoben. Diese Fragebogendaten betrafen Rasse, Alter, Geschlecht, Sexualzyklus, Trächtigkeiten, Hormonbehandlungen, systemische Erkrankungen, Bluttransfusionen, Todesart, Frischegrad der untersuchten Gewebe, Diagnose des Mammatumors, pathologisch-anatomische Diagnosen sowie Erkrankungen, Operationen oder Verletzungen im Einzugsgebiet der oberflächlichen Leistenlymphknoten. Der Frischegrad wurde mit frisch (kein Verwesungsprozess erkennbar), relativ frisch (geringgradige Sulfmethämoglobinbildung im Abdomen), nicht mehr frisch (deutliche Sulfmethämoglobinbildung in verschiedenen Organen) und hochgradig fortgeschrittene postmortale Veränderungen (deutliche Sulfmethämoglobinbildung im

gesamten Körper und Konsistenzverlust der Organe) angegeben. Alle Daten sind in Kapitel 9.2. aufgeführt.

Für alle kastrierten Hunde dieser Dissertation gilt, dass die Zeit zwischen Kastration und Entnahme der untersuchten Gewebe mehr als 6 Wochen betrug.

3.2. Methoden

3.2.1. Präparation der Gewebe

Von sezierten Hunden entnommene Gewebe wurden in neutral gepuffertem Formalin (s. Kapitel 9.1.1.) für 24 Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Die von Tierärzten eingesandten Gewebe waren bereits in ungepuffertem Formalin fixiert. Die Gewebeteile wurden anschließend in ca. 0,5 cm dicke Stücke geschnitten und in Einbettkassetten gelegt. Die Proben wurden nach dem Routineverfahren des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen im Einbettungsautomaten (Tissue Tek®) weiter prozessiert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 2-3 µm dicke Schnitte angefertigt, die im Wasserbad bei ca. 40 °C gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Für die Immunhistologie wurden SuperFrost®Plus-Objektträger verwendet.

Bezugsquellen für die verwendeten Chemikalien und Geräte sind in Kapitel 9.1.2. zu finden.

3.2.2. Histologische Färbungen

3.2.2.1. Berliner Blau-Reaktion

Es wurden alle gesammelten Gewebeproben gefärbt. Als Positivkontrolle diente ein Schnitt von der hämosiderinhaltigen Milz eines 17 Jahre alten, weiblichen Schottischen Hochlandrindes (Tagebuchnummer S556/03).

Als positiv wurde eine blaue Färbung gewertet.

1. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol®) für 5 Minuten; Rehydrierung in Isopropanol, 96 % Alkohol, 70 % Alkohol und 50 % Alkohol für je 5 Minuten; waschen der Schnitte für 5 Minuten in Aqua dest.
2. Herstellen einer Lösung aus 0,25 g Kaliumhexacyanoferrat-II in 12,5 ml Aqua dest.; 20 Tropfen dieser Lösung in 60 ml 1 % Salzsäure geben; Inkubation der Schnitte für 35 Minuten in dieser Lösung; waschen in Aqua dest.
3. Gegenfärbung der Schnitte in Kernechtrot für 10 Minuten; waschen in Aqua dest.
4. Dehydrierung der Schnitte durch kurzes Schwenken in 50 % Alkohol, 70 % Alkohol, 96 % Alkohol, zweimal in Isopropanol und klären in Xylol-Ersatz (Roti-Histol®); eindecken mit Folie im Automaten (TissueTec®)

3.2.2.2. Turnbills Blau-Reaktion

Es wurden als Stichprobe 300 Lymphknoten der Kontrollen, 25 Milzen der Kontrollen, 30 oberflächliche Leistenlymphknoten der Fälle sowie 60 Mammatumoren und 50 Milchdrüsenschnitte der Fälle gefärbt. Die Mammatumoren setzten sich aus 4 einfachen Adenomen, 13 komplexen Adenomen, 8 tubulopapillären Karzinomen, 15 komplexen Karzinomen, 10 benignen Mischtumoren, 3 malignen Mischtumoren, 6 soliden Karzinomen und einem anaplastischen Karzinom zusammen.

Als positiv wurde eine blaue Färbung gewertet.

1. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 1 beschrieben
2. Inkubation der Schnitte für 60 Minuten in einer Lösung aus 0,8 g Kaliumhexacyanoferrat-III und 80 ml 0,06 N Salzsäure
3. Waschen in 1 % Essigsäure
4. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 3 beschrieben
5. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 4 beschrieben

3.2.2.3. Quinckes-Reaktion

Mit Hilfe der Quinckes-Reaktion, die sich aus einer Reduktionsreaktion und anschließender Turnbells Blau-Reaktion zusammensetzt, wurden Kontrollschnitte für die Turnbells Blau-Färbung aus caninen Lymphknoten mit dreiwertigem Eisen (Hämosiderin) hergestellt.

1. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 1 beschrieben
2. Reduktion des dreiwertigen Eisens für 24 Stunden in einer frisch angesetzten Ammoniumpolysulfid-Lösung (s. Kapitel 9.1.1.); waschen in Aqua dest.
3. Die weitere Färbung erfolgte mit den Schnitten für die Turnbells Blau-Reaktion (s. Kapitel 3.2.2.2. Punkte 2 – 4).

3.2.2.4. Hämatoxylin-Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte routinemäßig im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

3.2.2.5. Kontrollen für Aposiderin

Zur Feststellung der Reaktionen von Aposiderin in der Fluoreszenzmikroskopie, der Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion, im Bleichen mit Kaliumpermanganat und in der Long Ziehl-Neelsen-Reaktion wurden Schnitte von der hämosiderinhaltigen Milz eines 17 Jahre alten, weiblichen Schottischen Hochlandrindes (Tagebuchnummer S556/03) wie folgt präpariert:

1. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 1 beschrieben
2. Inkubation der Schnitte in 1 % Salzsäure für 40 Minuten; waschen in Aqua dest.
3. Die weitere Färbung erfolgte mit den anderen Schnitten der entsprechenden Färbungen (s. Kapitel 3.2.2.6., 3.3.2.7., 3.2.2.8. und 3.2.3.).

Zur Kontrolle auf verbliebenes Eisen wurde ein Schnitt in der Berliner Blau-Reaktion weiter gefärbt (s. Kapitel 3.2.2.1.). Dieser war Berliner Blau-negativ, d.h. das Eisen in den Kontrollschnitten für Aposiderin wurde

vollständig aus dem Hämosiderin gelöst.

3.2.2.6. Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion

Für die Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion wurden als Stichprobe 10 Schnitte von caninen Lymphknoten gewählt, die ausschließlich BBn-Pigment oder deutlich mehr BBn-Pigment als Hämosiderin enthielten. Zusätzlich wurde ein Schnitt aus den Kontrollen für Aposiderin (s. Kapitel 3.2.2.5.) und ein Schnitt vom Kleinhirn eines 17 Jahre alten Warmblut-Wallachs mit altersbedingter Lipofuszinablagerung in den Purkinje-Zellen (Tagebuchnummer S835/08) gefärbt.

Als positiv wurde eine blaue Färbung gewertet.

1. Wie in Kapitel unter 3.2.2.1. Punkt 1 beschrieben
2. Inkubation der Schnitte für 20 Minuten in einer frisch angesetzten Mischung aus gleichen Teilen einer 1 % Eisen(III)chlorid-Lösung und einer 1 % Kaliumferrizyanid-Lösung; fließend wässern
3. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 4 beschrieben

3.2.2.7. Bleichen

Für das Bleichen mit Kaliumpermanganat wurden als Stichprobe 10 Schnitte von caninen Lymphknoten gewählt, die ausschließlich BBn-Pigment oder deutlich mehr BBn-Pigment als Hämosiderin enthielten. Zusätzlich wurde ein Schnitt aus den Kontrollen für Aposiderin (s. Kapitel 3.2.2.5.) und ein Schnitt vom Kleinhirn eines 17 Jahre alten Warmblut-Wallachs mit altersbedingter Lipofuszinablagerung in den Purkinje-Zellen (Tagebuchnummer S835/08) gefärbt.

Als positiv wurde eine vollständige Entfärbung des Pigments gewertet.

1. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 1 beschrieben
2. Inkubation der Schnitte für 45 Minuten in einer 1 % Kaliumpermanganat-Lösung
3. Auftropfen einer 2 % Kaliumdisulfit-Lösung bis der Schnitt weißlich erscheint;

kurz fließend wässern

4. Inkubation der Schnitte für 3 Minuten in Papanicolaous Hämatoxylin (1:10 in Aqua dest.); bläuen in lauwarmem Leitungswasser für 5 Minuten; waschen in Aqua dest.
6. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 4 beschrieben

3.2.2.8. Long Ziehl-Neelsen-Reaktion

Für die Long Ziehl-Neelsen-Reaktion wurden als Stichprobe 10 Schnitte von caninen Lymphknoten gewählt, die ausschließlich BBn-Pigment oder deutlich mehr BBn-Pigment als Hämosiderin enthielten. Zusätzlich wurde ein Schnitt aus den Kontrollen für Aposiderin (s. Kapitel 3.2.2.5.) und ein Schnitt vom Kleinhirn eines 17 Jahre alten Warmblut-Wallachs mit altersbedingter Lipofuszinablagerung in den Purkinje-Zellen (Tagebuchnummer S835/08) gefärbt.

Als positiv wurde eine rote Färbung gewertet.

1. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 1 beschrieben
2. Inkubation der Schnitte für 3 Stunden bei 60 °C in Karbolfuchsin-Lösung (s. Kapitel 9.1.2.); abkühlen bei Raumtemperatur für 30 Minuten; fließend wässern
3. Inkubation der Schnitte in 1 % Salzsäure-Alkohol (50 % Isopropanol) bis Erythrozyten blass rosa erscheinen; waschen in Aqua dest. für 10 Minuten
4. Inkubation der Schnitte für 5 Minuten in Mayers Häkalaun (s. Kapitel 9.1.2.); bläuen in lauwarmem Leitungswasser für 5 Minuten
5. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 4 beschrieben

3.2.3. Fluoreszenzmikroskopie

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurden als Stichprobe 30 canine Lymphknoten gewählt, die ausschließlich BBn-Pigment oder deutlich mehr BBn-Pigment als Hämosiderin enthielten. Zusätzlich wurde ein Schnitt aus den Kontrollen für Aposiderin (s. Kapitel 3.2.2.5.) untersucht. Als Positivkontrolle diente ein Schnitt vom Kleinhirn eines 17 Jahre alten Warmblut-Wallachs mit altersbedingter Lipofuszinablagerung in den Purkinje-Zellen (Tagebuchnummer S835/08).

Als positiv wurde eine gelbe bis orangefarbene Autofluoreszenz gewertet.

1. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol-Ersatz (Roti-Histol®) für 5 Minuten; Rehydrierung in Isopropanol, 96 % Alkohol, 70 % Alkohol und 50 % Alkohol für je 5 Minuten
2. Wie in Kapitel 3.2.2.1. unter Punkt 4 beschrieben
3. Untersuchung der ungefärbten Schnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem Anregungsfilter von 450 - 490 nm und einem Sperrfilter von 510 nm

3.2.4. Immunhistologie

Es wurden als Stichprobe 56 Lymphknoten der Kontrollen, 4 Milzen der Kontrollen, 55 oberflächliche Leistenlymphknoten der Fälle, 61 Mammatumoren und 24 Milchdrüsenschnitte der Fälle gefärbt. Die Mammatumoren setzten sich aus 10 einfachen Adenomen, 10 komplexen Adenomen, 10 tubulopapillären Karzinomen, 10 komplexen Karzinomen, 10 benignen Mischtumoren, 5 malignen Mischtumoren, 3 soliden Karzinomen, 2 Fibroadenomen und einem anaplastischen Karzinom zusammen. Zur Testung der Kreuzreaktion des Primärantikörpers mit caninem Laktoferrin diente menschliches Milchdrüsengewebe (freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie des Fachbereichs Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Prof. Dr. R.M. Bohle) als Positivkontrolle.

Als positiv wurde eine grüne Färbung (Substrat-Chromogen HISTOPRIME® HistoGreen) gewertet.

3.2.4.1. Zum Nachweis von caninem Laktoferrin verwendete Materialien

Antikörper:

- Primärantikörper: Gegen menschliches Laktoferrin gerichteter polyklonaler Antikörper vom Schaf: 5605-1004, Lactoferrin: Antibody, sheep; Biogenesis Ltd., Poole, UK; 1:1000 in 1 % bovinem Serumalbumin (verdünnt in TBS, s. Kapitel 9.1.1.) verdünnt
- Sekundärantikörper: Gegen ovines IgG gerichteter biotinylierter Antikörper vom Kaninchen: BA-6000, biotinylated anti-sheep IgG (H+L), made in rabbit; Vector Laboratories, Burlingame, USA; 1:500 in TBS verdünnt

Seren:

- Blocken und Negativkontrolle (statt Sekundärantikörper): 1 % Kaninchenserum (verdünnt in TBS); Kaninchenserum:

Zentrifugieren des Vollbluts von gesunden Kaninchen nach 2-4 Stunden stehen bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 3500 rpm; absaugen des Serums; Lagerung bei -20 °C

- Negativkontrolle (statt Primärantikörper): 0,1 % aufgereinigtes Schafserum (verdünnt in TBS); Aufreinigung des Serums und Proteinbestimmung:
 1. Zentrifugieren des Vollblut von gesunden Schafen nach 2-4 Stunden stehen bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 3500 rpm; absaugen des Serums
 2. Herstellung einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung: Lösen von 76 g Ammoniumsulfat in 100 ml Aqua dest. bei Raumtemperatur; weitere Zugabe von Ammoniumsulfat bis zur Ausfällung von Ammoniumsulfatkristallen; Abkühlung der gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung auf 4 °C; vor Gebrauch nochmals gut rühren
 3. Langsames Eintropfen von 4 ml der gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung in 4 ml Serum bei 4 °C unter ständigem Rühren; weiteres Rühren des Serums für 2 Stunden bei 4 °C

4. Zentrifugieren des Serums bei 4 °C und 5000 rpm für 20 Minuten; verwerfen des Überstands
5. Aufnahme des Sediments in 44 ml einer auf 4 °C gekühlte 50 % Ammoniumsulfat-Lösung; zentrifugieren des Serums bei 4 °C und 5000 rpm für 20 Minuten; verwerfen des Überstands
6. Punkt 5. wiederholen
7. Aufnahme des Sediments in 2,6 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8 (s. Kapitel 9.1.1.); entsalzen dieser Lösung über eine Säule (PD-10 Desalting column; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8
8. Proteinbestimmung mit Hilfe eines Test-Kits (BCA™ Protein Assay Kit)
9. Lagerung bei -20 °C
10. Einstellung des Serums und des verwendeten Antikörpers auf gleiche Proteinkonzentration (16 mg/ml) durch Verdünnung des Serums mit TBS

Detektionssystem:

- Avidin-Biotin-Komplex: Vectastain® ABC Kit peroxidase standard PK-4000; Vector Laboratories, Burlingame, USA
- HISTOPRIME® HistoGreen; Linaris, Wertheim-Bettingen; Substrat-Kit mit HistoGreen Chromogen, HistoGreen-Puffer und Wasserstoffperoxid

Demaskierung:

- Zitratpuffer 10 mM pH 6,0 (s. Kapitel 9.1.1.)

3.2.4.2. Laborprotokoll der Immunhistologie

1. Entparaffinieren der Schnitte in 3 Bädern Xylol-Ersatz (Roti-Histol®) für je 3 Minuten; Rehydrierung zweimal in Isopropanol, einmal in 96 % Alkohol und einmal in 80 % Alkohol für je 3 Minuten
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in frisch angesetztem 0,5 % H₂O₂ in Methanol für 30 Minuten; waschen in TBS (pH 7,6; s. Kapitel 9.1.1.) für 5 Minuten
3. Inkubation der Schnitte in 10 mM Zitratpuffer (pH 6,0; s. Kapitel 9.1.1.) in Plastikküvetten im Wasserbad bei 97 °C für 20 Minuten; Abkühlung der Schnitte bei Raumtemperatur für 15 Minuten; waschen in TBS
4. Aufbringen der Objektträger auf Shandon® Coverplates™; blocken mit 1 % Kaninchenserum für 30 Minuten
5. Auftragen des 1:1000 verdünnten Primärantikörper (gegen menschliches Laktoferrin gerichteter polyklonaler Antikörper vom Schaf) oder der Negativkontrollen TBS oder 0,1 % aufgereinigtes Schafserum; Inkubation bei 4 °C über Nacht; dreimaliges waschen in TBS in den Coverplates™
6. Auftragen des 1:500 verdünnten Sekundärantikörper (gegen ovines IgG gerichteter biotinylierter Antikörper vom Kaninchen) oder der Negativkontrolle 1 % Kaninchenserum; Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten; dreimaliges waschen in TBS in den Coverplates™
7. Auftragen des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (je 0,9 µl der Lösungen A und B in 1 ml TBS) und Inkubation der Schnitte für 30 Minuten; dreimaliges waschen in TBS in den Coverplates™
8. Auftragen der angemischten HISTOPRIME® HistoGreen-Reaktionslösung (0,5 ml HistoGreen-Puffer, 1 Tropfen HistoGreen-Chromogen und 1 Tropfen H₂O₂ des Substrat-Kits) und Inkubation der Schnitte für 15 Minuten; waschen in TBS für 2 Minuten und kurzes waschen in Aqua dest.
9. Gegenfärbung der Schnitte in Papanicolaous Hämatoxylin (1:10 in Aqua dest.) für 20 Sekunden; bläuen in lauwarmem Leitungswasser für 5 Minuten;

waschen in Aqua dest.

10. Dehydrierung der Schnitte drei mal in Isopropanol und zwei mal in Roti-Histol® für je ca. 30 Sekunden; eindecken mit Folie im Automaten (TissueTec®)

3.2.5. Histologische Untersuchung

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Schnitte erfolgte bei den Objektivvergrößerungen 2,5fach, 10fach, 20fach und 40fach.

3.2.5.1. Berliner Blau-Reaktion

Canine Lymphknoten, Mammatumoren, unverändertes Milchdrüsengewebe und Milz wurden auf eine Berliner Blau-positive Reaktion untersucht.

3.2.5.1.1. Lymphknoten

Bei der 2,5fachen Objektivvergrößerung wurde eine semiquantitative Schätzung über den Grad der Speicherung Berliner Blau-positiven Pigments (Hämosiderin) im Marksinus der Lymphknoten durchgeführt. Dabei wurde geschätzt, wie viel Prozent des Marksinus von der Hämosiderinspeicherung betroffen ist (Hämosiderosegrad der Lymphknoten). Gelegentlich war eine Hämosiderinspeicherung auch im Randsinus der Lymphknoten zu finden. Der Randsinus nahm aber im Vergleich zum Marksinus immer eine wesentlich geringere Fläche des Schnittes ein und es handelte sich um sehr geringe Mengen an Hämosiderin, so dass dieser Befund keine Auswirkung auf die Gradeinteilung des Lymphknotens hatte. Auch die Hämosiderinspeicherung im Parenchym des Lymphknotens war nur sehr gering und hatte keine Auswirkungen auf die Gradeinteilung des Lymphknotens.

Weiterhin wurden eine Berliner Blau-positive Reaktion des Bindegewebes der Lymphknotentrabekel erfasst. Diese erschien immer als diffuse, extrazelluläre Berliner Blau-positive Reaktion (s. Abbildung 11, Kapitel 4.2.1.1.) und ist vermutlich

auf eine Bindung von Hämosiderin zurückzuführen (s. Kapitel 2.1.2.1.).

Außerdem wurde eine semiquantitative Schätzung über das Auftreten von BBn-Pigment (s. Kapitel 2.2.4.) durchgeführt. Folgende Bewertungsstufen wurden dafür verwendet: 0 = keine BBn-pigmenthaltigen Makrophagen, 1 = vereinzelte BBn-pigmenthaltige Makrophagen, 2 = wenige BBn-pigmenthaltige Makrophagen, 3 = einige BBn-pigmenthaltige Makrophagen, 4 = viele BBn-pigmenthaltige Makrophagen, 5 = sehr viele BBn-pigmenthaltige Makrophagen.

3.2.5.1.2. Milz

Bei der 2,5fachen Objektivvergrößerung wurde eine semiquantitative Schätzung über den Grad der Speicherung Berliner Blau-positiven Pigments (Hämosiderin) in der roten Pulpa der Milz durchgeführt. Dabei wurde geschätzt wie viel Prozent der roten Pulpa von der Hämosiderinspeicherung betroffen ist (Hämosiderosegrad der Milz). Da in der weißen Pulpa kein Hämosiderin zu finden war, wurde diese in der Schätzung nicht berücksichtigt.

Eine Berliner Blau-positive Reaktion des Bindegewebes der Milztrabekel sowie das Auftreten von BBn-Pigment in der Milz wurde wie bei den Lymphknoten (s. Kapitel 3.2.5.1.1.) erfasst.

3.2.5.1.3. Mammatumoren und unverändertes Milchdrüsengewebe

Bei den Mammatumoren und dem unveränderten Milchdrüsengewebe wurde eine semiquantitative Schätzung über die Anzahl Berliner Blau-positiver Makrophagen im Stroma, Berliner Blau-positiver Drüsenepithelien, Berliner Blau-positiver Makrophagen im Drüsenlumen sowie über das Auftreten von Berliner Blau-positivem Sekret im Drüsenlumen durchgeführt (= Eisenspeicherung im Mammatumor und unveränderten Milchdrüsengewebe). Folgende Bewertungsstufen wurden dafür verwendet: 0 = keine Berliner Blau-positive Reaktion, 1 = vereinzelt(e) Berliner Blau-positive(s) Zellen/Sekret, 2 = wenig(e) Berliner Blau-positive(s) Zellen/Sekret,

3 = einige(s) Berliner Blau-positive(s) Zellen/Sekret, 4 = viel(e) Berliner Blau-positive(s) Zellen/Sekret, 5 = sehr viel(e) Berliner Blau-positive(s) Zellen/Sekret.

3.2.5.2. Turnbolls Blau-Reaktion

Die Auswertung der Turnbolls Blau-gefärbten Schnitte erfolgte wie bei den Berliner Blau-gefärbten.

3.2.5.3. Quinckes-Reaktion

Mit Hilfe der Reduktionsreaktion der Quinckes-Reaktion wurden Positivkontrollen für die Turnbolls Blau-Reaktion aus caninen Lymphknoten mit dreiwertigem Eisen (Hämosiderin) hergestellt.

3.2.5.4. Hämatoxylin-Eosin

3.2.5.4.1. Lymphknoten

Es wurden Neoplasien, follikuläre Hyperplasie, Sinushistiozytose, Hyperämie, Erythrozyten im Sinus, Hyperämie mit Erythrozyten in Sinus und Gewebe, Sinusödem und Infiltration des Lymphknotens mit neutrophilen Granulozyten erfasst.

3.2.5.4.2. Milz

Es wurden Neoplasien, Hyperplasie, Hyperämie und extramedulläre Hämatopoese erfasst.

3.2.5.5. Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion

BBn-Pigment in Makrophagen caniner Lymphknoten wurde auf eine positive Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion (Blau-Färbung) untersucht. Der Befund wurde mit positiv (+) oder negativ (-) angegeben.

3.2.5.6. Bleichen

BBn-Pigment in Makrophagen caniner Lymphknoten wurde auf Bleichbarkeit mit Kaliumpermanganat untersucht. Als positiv (+) wurde eine vollständige Entfärbung des Pigments gewertet.

3.2.5.7. Long Ziehl-Neelsen-Reaktion

BBn-Pigment in Makrophagen caniner Lymphknoten wurde auf eine positive Long Ziehl-Neelsen-Reaktion (Rot-Färbung) untersucht. Der Befund wurde mit positiv (+) oder negativ (-) angegeben.

3.2.5.8. Fluoreszenzmikroskopie

BBn-Pigment in Makrophagen caniner Lymphknoten wurde auf Autofluoreszenz bei einer Anregung von 450 - 490 nm und einem Sperrfilter von 510 nm untersucht. Als positiv (+) wurde eine gelbe bis orangefarbene Autofluoreszenz gewertet.

3.2.5.9. Immunhistologie

3.2.5.9.1. Lymphknoten und Milz

Canine Lymphknoten und Milzen wurden auf eine Laktoferrin-positive Reaktion (grüne Färbung mit Substrat-Chromogen HISTOPRIME® HistoGreen) der Zellen sowie der Lymphe untersucht. Die Anzahl Laktoferrin-positiver Zellen und Lymphe wurde semiquantitativ erfasst. Folgende Bewertungsstufen wurden dafür verwendet: 0 = keine Laktoferrin-positive Reaktion, 1 = vereinzelt(e) Laktoferrin-positive Zellen/Lymphe, 2 = wenig(e) Laktoferrin-positive Zellen/Lymphe, 3 = einige Laktoferrin-positive Zellen/Lymphe, 4 = viel(e) Laktoferrin-positive Zellen/Lymphe, 5 = sehr viel(e) Laktoferrin-positive Zellen/Lymphe.

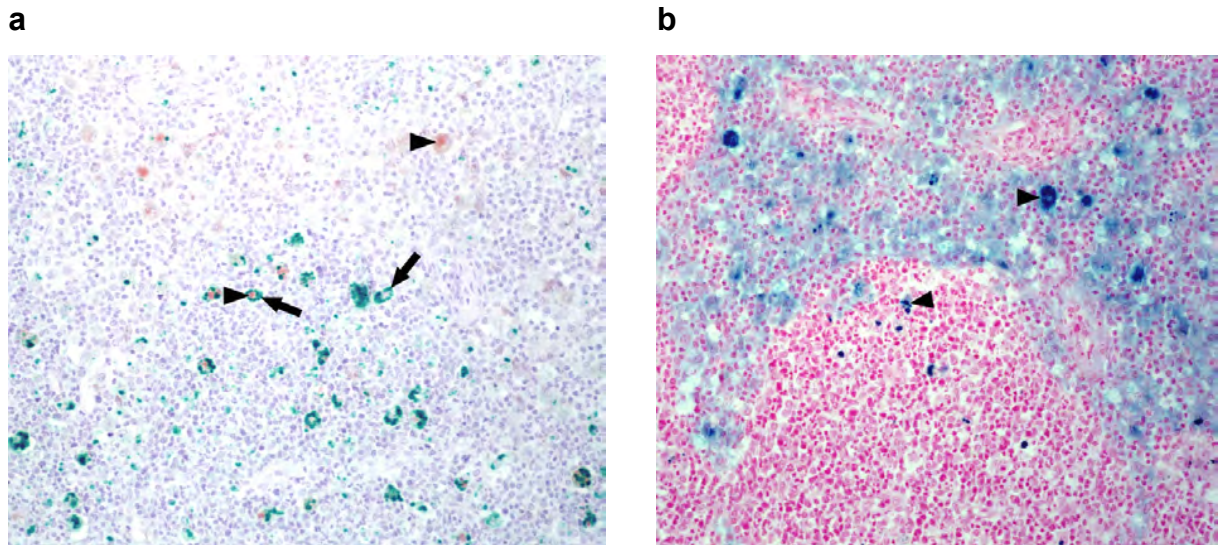


Abbildung 7: Serienschnitte eines caninen Lymphknotens immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt. **a** Laktoferrin-positive Makrophagen (Pfeile) und braunes, Laktoferrin-negatives Pigment (Pfeilspitzen) in Makrophagen. Obj. x 20. Schaf anti-humanen Laktoferrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. **b** Hämosiderinhaltige Makrophagen (Pfeilspitzen). Obj. x 20. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

Die Lokalisation eines Laktoferrin-positiven Befundes in Lymphknoten und Milzen wurde mit der Lokalisation braunen Pigments sowie mit einer Berliner Blau-positiven Reaktion in Serienschnitten verglichen (s. Abbildung 7), die für alle 16 Laktoferrin-positiven Lymphknoten und alle 3 Laktoferrin-positiven Milzen durchgeführt wurden.

3.2.5.9.2. Mammatumoren und unverändertes Milchdrüsengewebe

Die Untersuchung auf eine Laktoferrin-positive Reaktion caniner Mammatumoren und unveränderten Milchdrüsengewebes erfolgte wie bei den Berliner Blau-gefärbten Schnitten (s. Kapitel 3.2.5.1.3.). Die Lokalisation eines Laktoferrin-positiven Befundes wurde mit der Lokalisation braunen Pigments sowie mit einer Berliner Blau-positiven Reaktion in Serienschnitten verglichen (s. Abbildung 8), die für alle 29 Laktoferrin-

positiven Mammatumoren und für die eine Laktoferrin-positive, unveränderte Milchdrüse durchgeführt wurden.

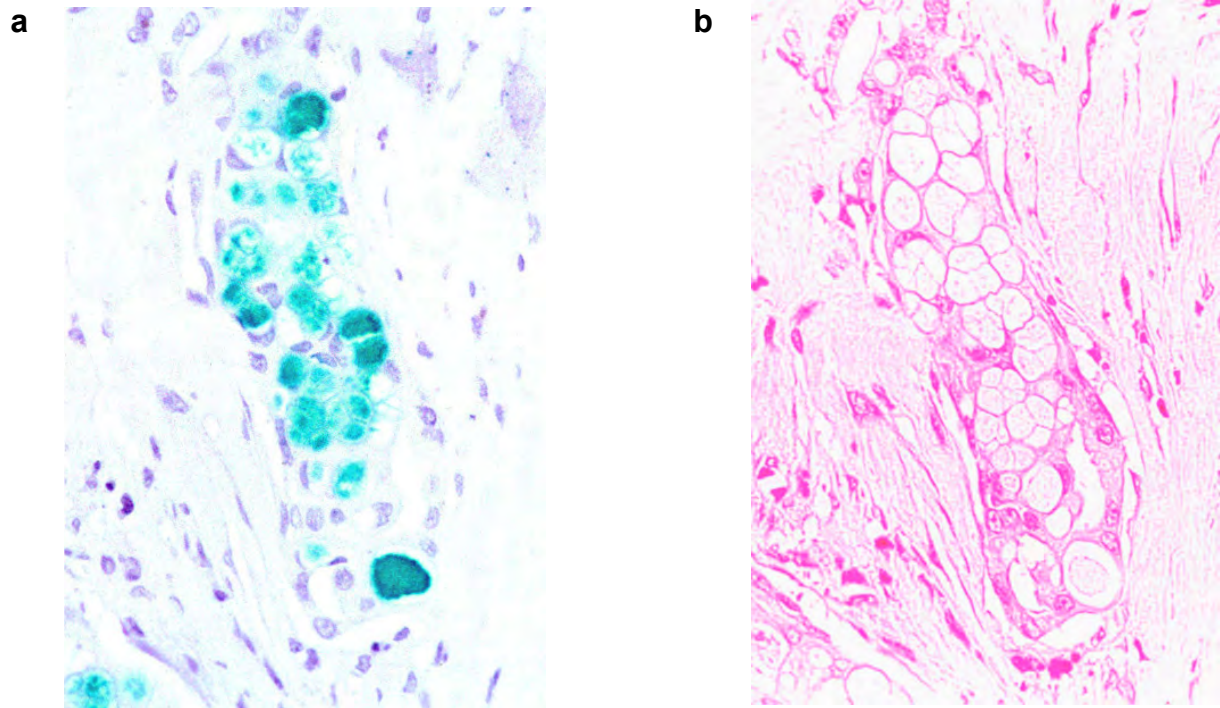


Abbildung 8: Serienschnitte eines komplexen Karzinoms in einer caninen Milchdrüse immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt. **a** Laktoferrin-positive Tumorzellen des komplexen Karzinoms. Obj. x 40. Schaf anti-humanes Laktoferrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. **b** Berliner Blau-negative Zellen des komplexen Karzinoms. Obj. x 40. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

3.2.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen auf deren Rechnern unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0, (BMDP Statistical Software, Inc., Los Angeles, USA), der Programme StatXact und Testimate sowie eines

Eigenprogramms der Arbeitsgruppe.

Zur Datenbeschreibung semiquantitativer Merkmale wurden Stichprobenumfänge, Minima, Maxima, Mediane und Quartile (Q1 und Q3) berechnet. Qualitative Merkmale wurden nach Gruppen getrennt ausgezählt.

Zur Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde bei semiquantitativen Merkmalen der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, wenn viele Bindungen vorlagen der exakte Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, mittels des Programms BMDP3S durchgeführt. Wenn mehr als 2 Gruppen vorlagen wurde der Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem paarweisen Vergleich nach Nemenyi mittels des Programms StatXact angewendet. Zur Prüfung des Zusammenhanges von normalverteilten Merkmalen mit semiquantitativen Merkmalen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mittels des Programms BMDP7D durchgeführt. Die Darstellung und Bewertung der Zusammenhänge quantitativer Merkmale erfolgte mit Hilfe von Korrelationsanalysen mittels des Programms BMDP6D, bei ordinalen (semiquantitativen) Merkmalen mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman mittels des Programms BMDP3D. Zum Vergleich unabhängiger Stichproben wurde der t-Test mittels des Programms BMDP3D durchgeführt. Die Prüfung von Mittelwertunterschieden bei abhängigen Stichproben für mindestens ordinale Merkmale erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Test für Paardifferenzen mittels des Programms BMDP3D. Wenn mehr als zwei abhängige Stichproben für mindestens ordinale Merkmale vorlagen wurde der Friedman-Rang-Test mittels des Programms BMDP3F angewendet. Bei 4-Felder-Tafeln wurde der exakte Fisher-Test mittels des Programms BMDP4F durchgeführt. Wenn mehr als 4 Felder vorlagen, wurde der verallgemeinerte exakte Test von Fisher mit Hilfe eines Eigenprogramms der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung angewendet.

Zur Bewertung statistischer Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt. Somit wurden Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Ergebnisse mit $p = 0,051 - 0,099$ wurden als knapp nicht signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1. Fragebogendaten

4.1.1. Fälle (Hunde mit Mammatumoren)

Die statistisch ausgewerteten Fragebogendaten zu den 100 Fällen sind in den Tabellen 3 und 4 aufgeführt. Alle Daten der Fälle finden sich in Kapitel 9.2.

Tabelle 3: Fragebogendaten der Fälle

Fragebogendaten		Anzahl der Hunde
Geschlecht	Weiblich-intakt	80
	Weiblich-kastriert	20
Alter in Jahren	4 - 15	100
Regelmäßigkeit der Läufigkeit	Regelmäßig	31
	Unregelmäßig	4
Auftreten von Scheinträchtigkeiten	Regelmäßig	16
	Unregelmäßig	15
	Nie	30

Tabelle 4: Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung der 156 Mammatumoren der Fälle

Tumorart		Anzahl der Mammatumoren
Adenom	Einfach	14
	Komplex	41
Fibroadenom		2
Karzinom	Tubulopapillär	26
	Solid	7
	Anaplastisch	1
	Komplex	35
Misch tumor	Benigne	22
	Maligne	8

4.1.2. Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren)

Die statistisch ausgewerteten Fragebogendaten zu den 100 Kontrollen sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Alle Daten der Kontrollen finden sich in Kapitel 9.2.

Tabelle 5: Fragebogendaten der Kontrollen

Fragebogendaten		Anzahl der Hunde
Geschlecht	Weiblich-intakt	32
	Weiblich-kastriert	18
	Männlich-intakt	36
	Männlich-kastriert	14
Geschlechtsreife ¹	Juvenil	24
	Adult	76
Alter in Jahren	Jünger als 4	44
	4 - 15	56
Erkrankungen im Einzugsgebiet ²	Ja	44
	Nein	19
Erhalt einer Bluttransfusion	Ja	7
	Nein	21
Zeit seit Bluttransfusion in Tagen	0,5	2
	1	1
	4	1
	6	1
	14	2
Todesart	Euthanasiert	49
	Verstorben	44
Frischegrad der untersuchten Gewebe	Frisch	21
	Relativ frisch	34
	Nicht mehr frisch	16
	Hgr. fortgeschrittene postmortale Veränderungen	4

Legende s. nächste Seite

Legende Tabelle 5:

¹: Die Geschlechtsreife wurde anhand des Alters oder einer vorberichtlich genannten Läufigkeit festgelegt. Juvenile Hunde waren maximal 4 Monate alt oder vorberichtlich noch nicht läufig gewesen. Adulte Hunde waren mindestens 1,5 Jahre alt oder vorberichtlich bereits läufig gewesen; ²: Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen im Einzugsgebiet der oberflächlichen Leistenlymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung im oberflächlichen Leistenlymphknoten haben könnten. Dazu zählten Dermatitis, Verletzungen, Laparotomie und Mammektomie.

4.2. Ergebnisse der histologischen Untersuchung

4.2.1. Histologische Befunde der Fälle

(Hunde mit Mammatumoren)

4.2.1.1. *Lymphknoten*

Da bei der Auswertung der Befunde kein signifikanter Unterschied zwischen Lymphknoten unterschiedlicher Körperseite nachgewiesen werden konnte, werden die Befunde in der folgenden Tabelle 6 nicht nach Körperseite getrennt aufgeführt.

Tabelle 6: Ergebnisse der Berliner Blau-Reaktion, der H.E.-Färbung, der Turnbells Blau-Reaktion und der Immunhistologie der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Fälle

	Anzahl der Lymphknoten	
Hämosiderosegrad der Lymphknoten (n = 100)	0 %	12
	0,1 %	18
	1 %	15
	10 %	17
	20 %	11
	30 %	11
	40 %	5
	50 %	4
	60 %	4
	70 %	3
Hämosiderinhaltiges Bindegewebe ¹ (n = 100)		6
BBn-pigmenthaltige Makrophagen (n = 100)		30
Weitere Veränderungen ² (n = 100)		41
Turnbells Blau-positive Zellen (n = 30) ³		0
Laktoterrin-positive Makrophagen (n = 55) ⁴		7
Laktoterrin-positive Lymphknoten (n = 55) ⁵		1

¹: s. Kapitel 3.2.5.1.1.; ²: s. Kapitel 3.2.5.4., es traten follikuläre Hyperplasie, Erythrozyten im Marksinus und Sinusödem auf; ³: Es wurden als Stichprobe 30 oberflächliche Leistenlymphknoten der Fälle mit der Turnbells Blau-Reaktion gefärbt; ⁴: Es wurden als Stichprobe 55 oberflächliche Leistenlymphknoten der Fälle immunhistologisch auf Laktoterrin untersucht; ⁵: Dieser Lymphknoten zeigte auch Berliner Blau-positive Lymphknoten (s. Abbildungen 13 und 14, Kapitel 4.2.1.1.).

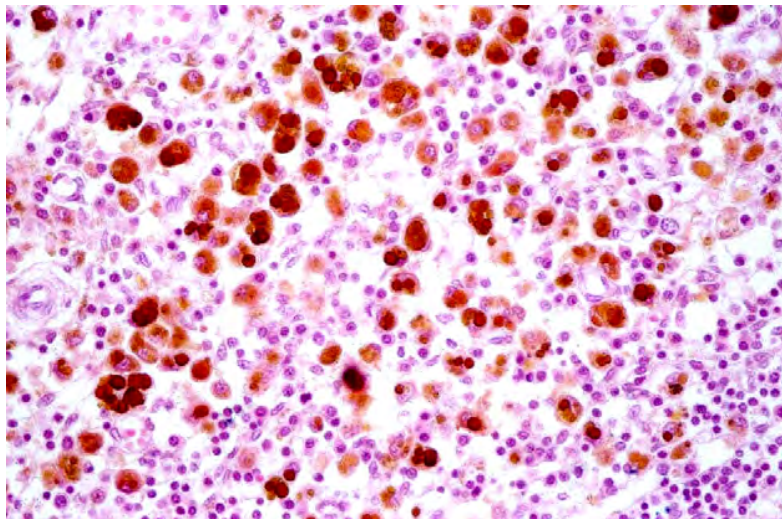


Abbildung 9: Hämosiderinhaltige Makrophagen im Marksinus eines caninen Lymphknotens (entspricht Abbildung 1, Kapitel 1.). Obj. x 40. Hämatoxylin-Eosin.

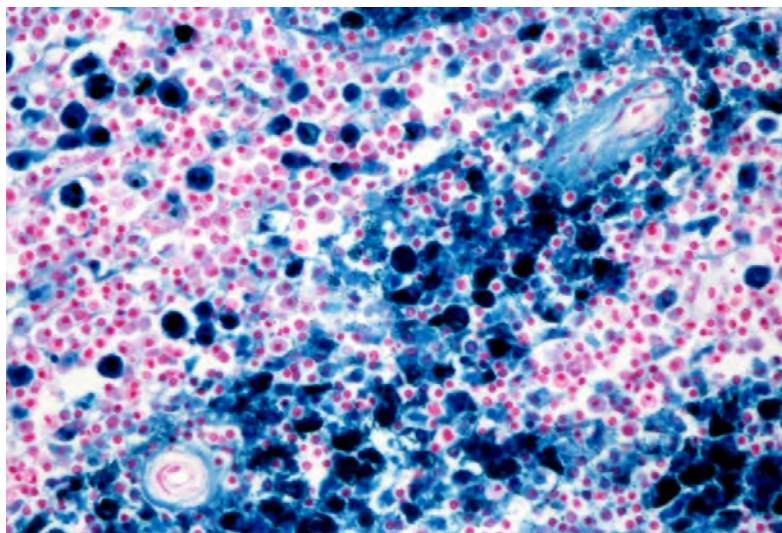


Abbildung 10: Hämosiderinhaltige Makrophagen im Marksinus eines caninen Lymphknotens (entspricht Abbildung 3, Kapitel 2.1.2.5.). Obj. x 40. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

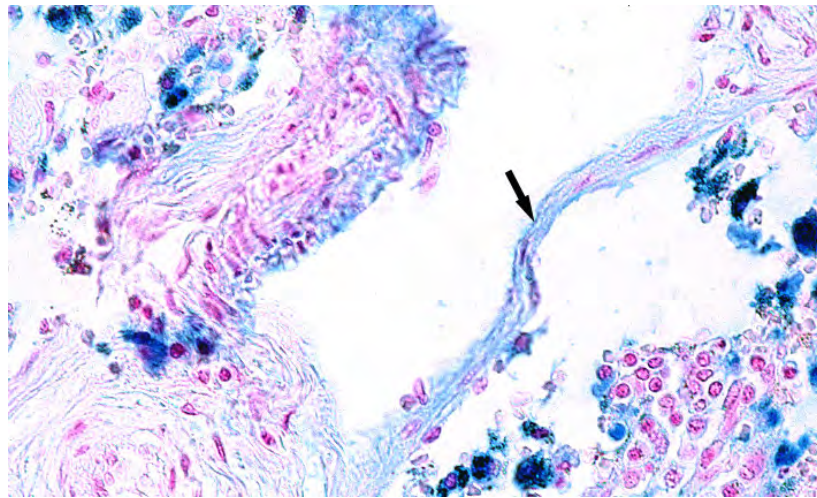


Abbildung 11: Hämosiderinhaltiges Bindegewebe (Pfeil) der Trabekel eines caninen Lymphknotens der eigenen Untersuchung (entspricht Abbildung 2, Kapitel 2.1.2.1.). Die Berliner Blau-positive Reaktion des Bindegewebes der Trabekel erschien in der eigenen Untersuchung immer diffus und extrazellulär. Obj. x 40. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

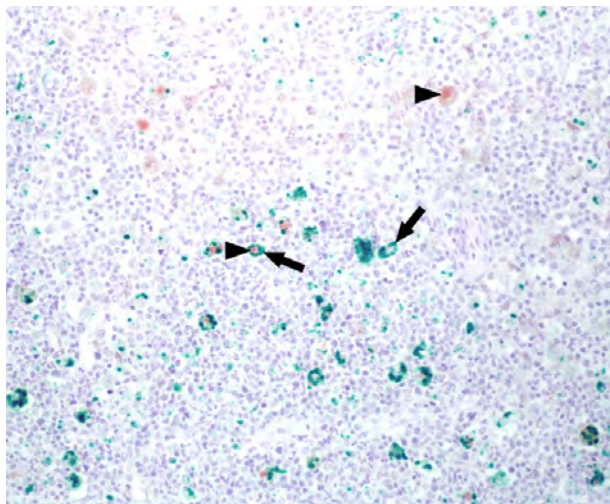
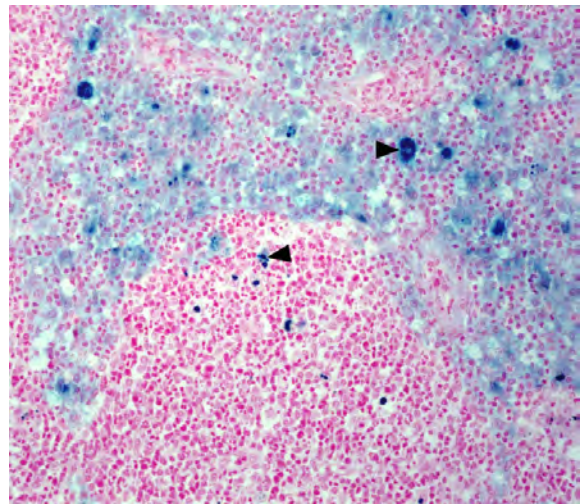
a

b


Abbildung 12: Serienschritte eines caninen Lymphknotens immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt (entspricht Abbildung 7, Kapitel 3.2.5.9.1.). **a** Laktoferrin-positive Makrophagen (Pfeile) und braunes, Laktoferrin-negatives Pigment (Pfeilspitzen) in Makrophagen. Obj. x 20. Schaf anti-humanen Laktoferrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. **b** Hämosiderinhaltige Makrophagen (Pfeilspitzen). Obj. x 20. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

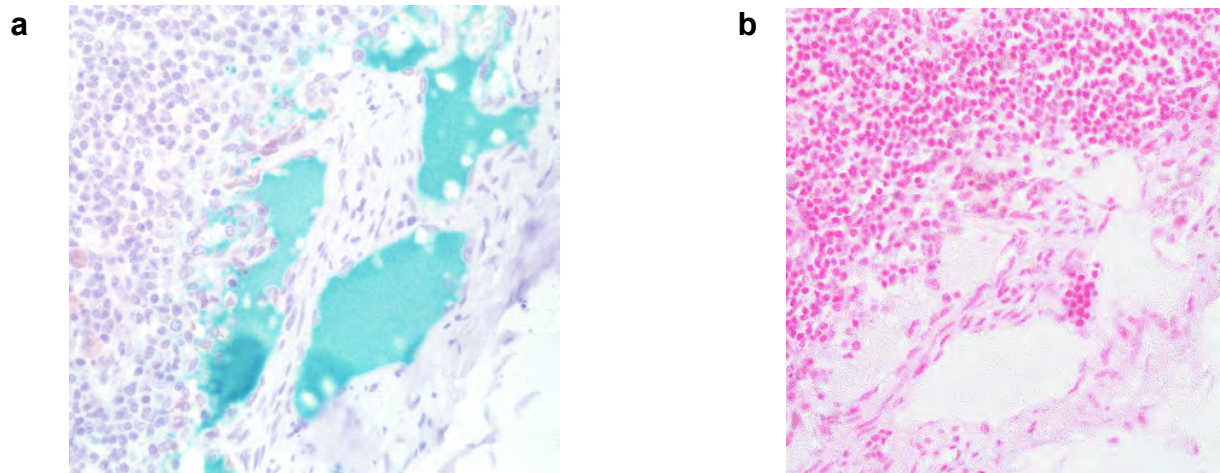


Abbildung 13: Serienschnitte eines caninen Lymphknotens immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt. **a** Laktotferrin-positive Lymphe. Obj. x 20. Schaf anti-humanen Laktotferrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. **b** Berliner Blau-negative Lymphe. Obj. x 20. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

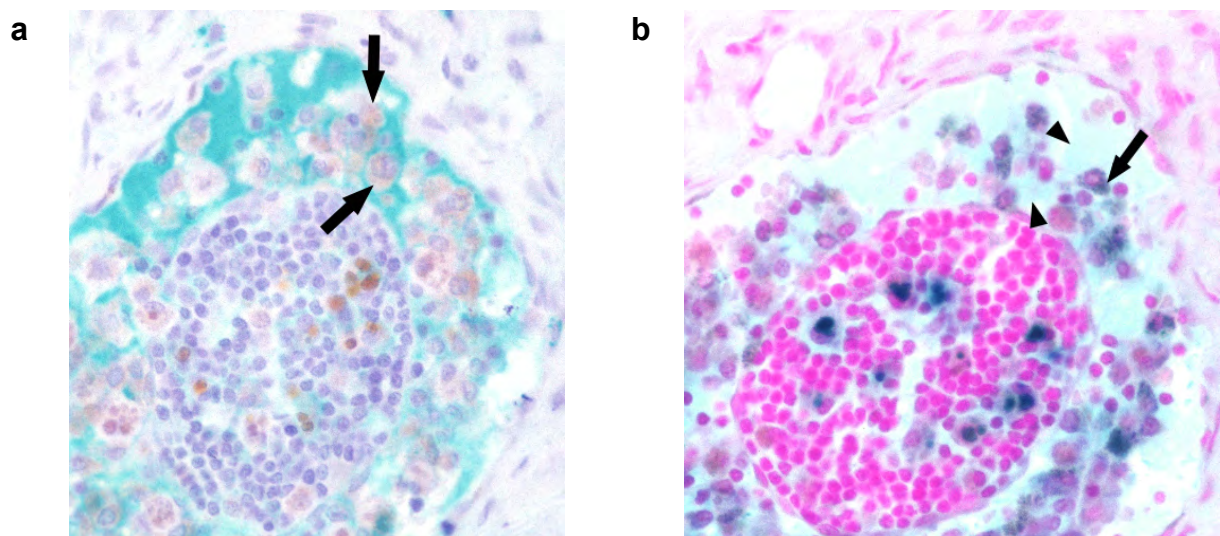


Abbildung 14: Serienschnitte des selben caninen Lymphknotens wie in Abbildung 13, immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt. **a** Laktotferrin-positive Lymphe und braunes, Laktotferrin-negatives Pigment in Makrophagen (Pfeile) des Randsinus. Obj. x 40. Schaf anti-humanen Laktotferrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. **b** Teilweise Berliner Blau-positive Lymphe (Pfeilspitzen; Hämosiderin oder Ferritin) und hämosiderinhaltige Makrophagen (Pfeil) im Randsinus. Obj. x 40. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

4.2.1.2. Mammatumoren**Tabelle 7:** Ergebnisse der Berliner Blau-Reaktion, der Turnbolls Blau-Reaktion und der Immunhistologie der Mammatumoren der Fälle

			Anzahl der Tumoren, die folgende Häufigkeit an positiven Zellen/Sekret aufwiesen:				
			Vereinzelte	Wenige	Einige	Viele	Sehr viele
Einfache Adenome	BB. (n = 14)	Makr. im Stroma	2	1	0	0	0
		Drüsenepithelien	0	1	0	0	0
		Makr. im Drüsenlumen	2	0	0	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	1	0	0	0	0
	TB. (n = 4) ¹	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
	Lf. (n = 10) ²	Makr. im Drüsenlumen	0	0	1	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	0	1	1	0	0
Komplexe Adenome	BB. (n = 41)	Makr. im Stroma	12	2	5	1	0
		Drüsenepithelien	0	1	1	0	0
		Makr. im Drüsenlumen	3	1	0	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	4	1	1	0	0
	TB. (n = 13) ¹	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
	Lf. (n = 10) ²	Makr. im Drüsenlumen	0	1	1	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	1	2	2	0	0
Fibroadenome	BB. (n = 2)	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
Tubulo-papilläre Karzinome	BB. (n = 26)	Makr. im Stroma	3	5	1	2	0
		Drüsenepithelien	0	0	1	0	0
		Makr. im Drüsenlumen	2	0	1	0	0
	TB. (n = 8) ¹	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
	Lf. (n = 10) ²	Makr. im Drüsenlumen	2	0	2	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	2	0	2	0	0
Solide Karzinome	BB. (n = 7)	Makr. im Stroma	2	1	0	0	1
		Makr. im Drüsenlumen	0	0	1	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	1	0	0	0	0
	TB. (n = 6) ¹	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
	Lf. (n = 3) ²	Makr. im Drüsenlumen	0	0	1	0	0
Anaplastisches Karzinom	BB. (n = 1)	Makr. im Stroma	0	0	0	0	1
	TB. (n = 1) ¹	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
	Lf. (n = 1) ²	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0

Fortsetzung und Legende s. nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 7

			Anzahl der Tumoren, die folgende Häufigkeit an positiven Zellen/Sekret aufwiesen:				
			Vereinzelte	Wenige	Einige	Viele	Sehr viele
Komplexe Karzinome	BB. (n = 35)	Makr. im Stroma	13	3	2	2	2
		Drüsenepithelien	0	1	0	0	0
		Makr. im Drüsenlumen	2	2	0	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	4	0	0	0	0
	TB. (n = 15) ¹	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
	Lf. (n = 10) ²	Drüsenepithelien	0	1	0	0	0
		Makr. im Drüsenlumen	0	2	2	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	1	2	5	0	0
Benigne Mischtumoren	BB. (n = 22)	Makr. im Stroma	8	0	0	0	0
	TB. (n = 10) ¹	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
	Lf. (n = 10) ²	Makr. im Drüsenlumen	1	0	0	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	1	0	1	2	0
Maligne Mischtumoren	BB. (n = 8)	Makr. im Stroma	4	1	1	0	0
		Makr. im Drüsenlumen	1	0	0	0	0
	TB. (n = 3) ¹	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
	Lf. (n = 5) ²	Makr. im Drüsenlumen	0	1	0	0	0
		Sekret im Drüsenlumen	0	2	0	1	0

BB.: Berliner Blau-positive(s) = Bei Makrophagen: Hämosiderin, bei Drüsenepithelien und Sekret im Drüsenlumen: Hämosiderin oder Ferritin (s. Kapitel 5.1.1.); Makr.: Makrophagen; TB.: Turnbells Blau-positive(s); Lf.: Laktoferrin-positive(s); ¹: Es wurden als Stichprobe 60 Mammatumoren der Fälle mit der Turnbells Blau-Reaktion gefärbt; ²: Es wurden als Stichprobe 61 Mammatumoren der Fälle immunhistologisch auf Laktoferrin untersucht.

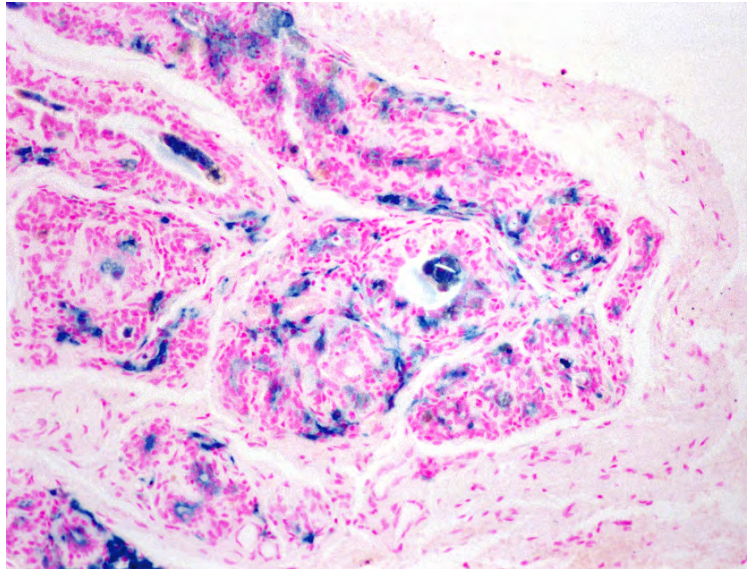


Abbildung 15: Berliner Blau-positive Drüsenepithelien (Hämosiderin oder Ferritin, s. Kapitel 5.1.1.) und hämosiderinhaltige Makrophagen im Stroma und im Drüsenlumen eines caninen komplexen Adenoms. Obj. x 10. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

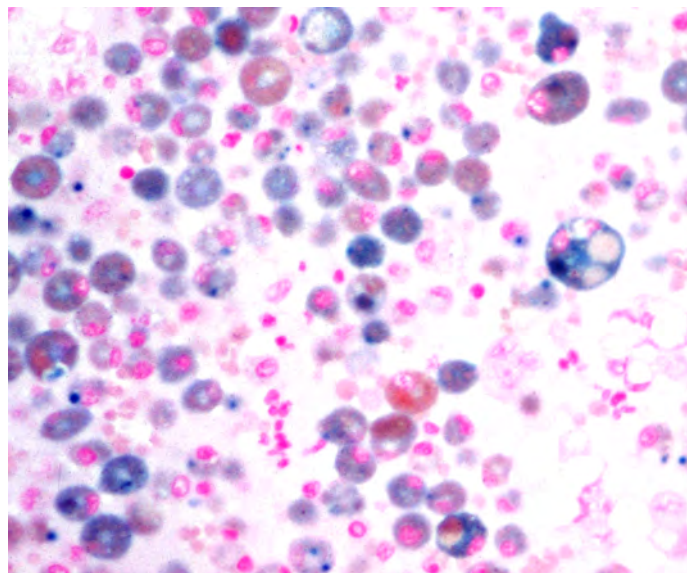


Abbildung 16: Hämosiderinhaltige Makrophagen im Drüsenlumen eines caninen komplexen Karzinoms. Obj. x 40. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

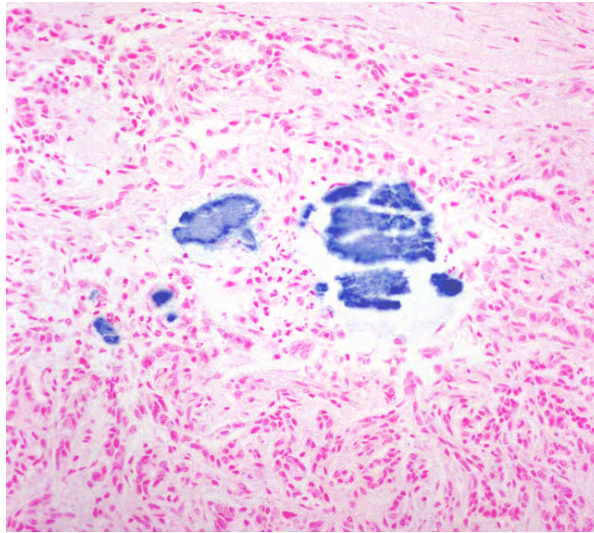


Abbildung 17: Berliner Blau-positives Sekret im Drüsenlumen (Hämosiderin oder Ferritin) eines caninen komplexen Karzinoms. Obj. x 20. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

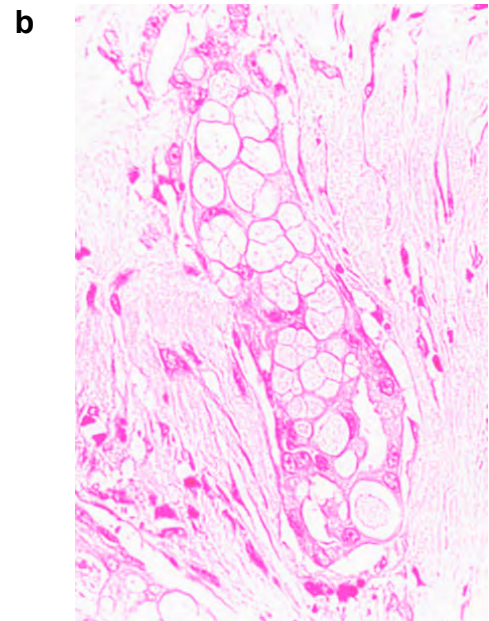
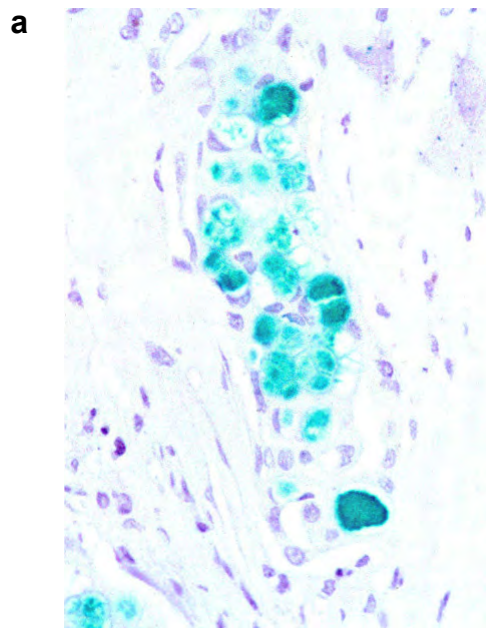


Abbildung 18: Serienschritte eines komplexen Karzinoms in einer caninen Milchdrüse immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt (entspricht Abbildung 8, Kapitel 3.2.5.9.2.). **a** Laktoferrin-positive Tumorzellen des komplexen Karzinoms. Obj. x 40. Schaf anti-humanen Laktoferrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. **b** Berliner Blau-negative Zellen des komplexen Karzinoms. Obj. x 40. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

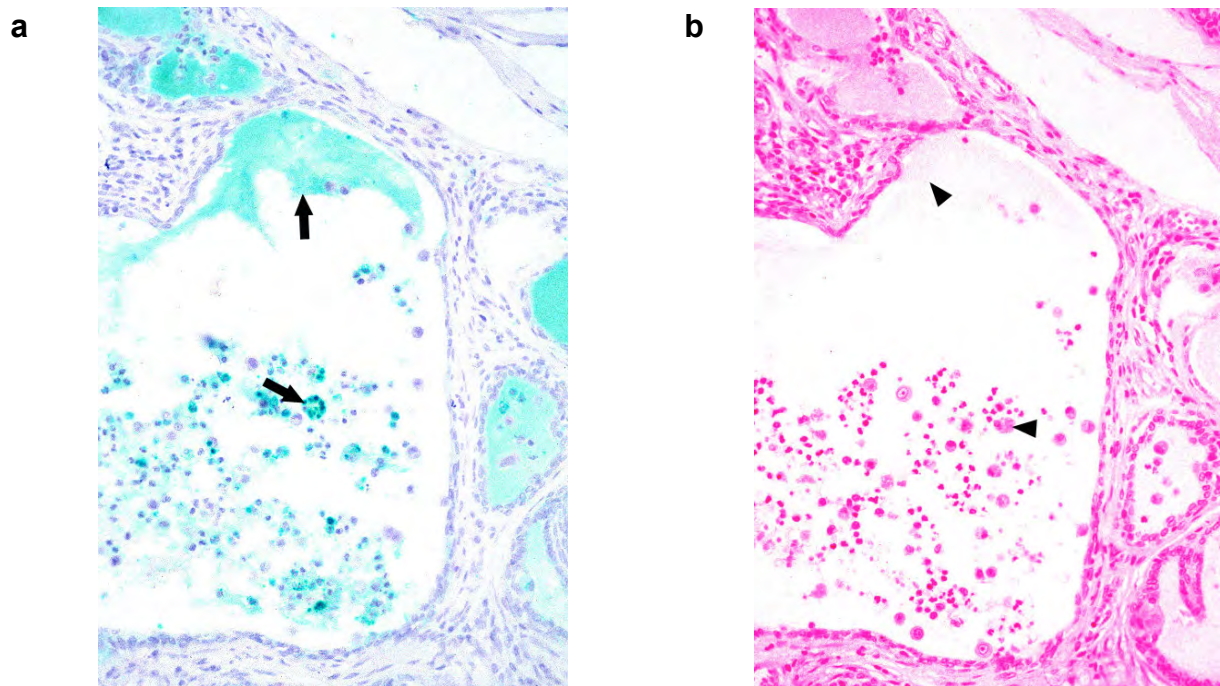


Abbildung 19: Serienschritte eines komplexen Adenoms in einer caninen Milchdrüse immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt. **a** Laktoferrin-positives Sekret und Laktoferrin-positiv Makrophagen (Pfeile) im Drüsenlumen des komplexen Adenoms. Obj. x 10. Schaf anti-humanes Laktoferrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. **b** Berliner Blau-negatives Sekret und Berliner Blau-negative Makrophagen (Pfeilspitzen) im Drüsenlumen des komplexen Adenoms. Obj. x 10. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

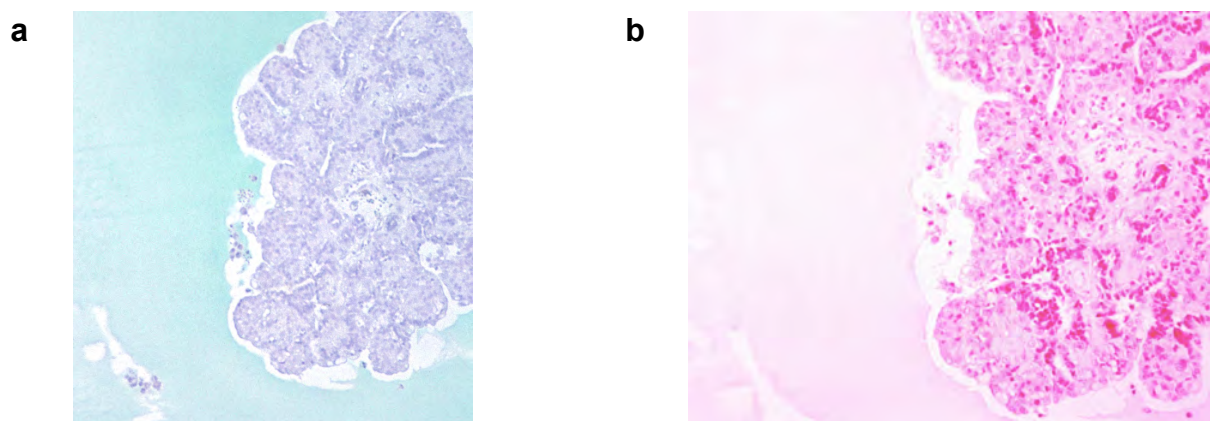


Abbildung 20: Serienschnitte eines komplexen Karzinoms in einer caninen Milchdrüse immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt. **a** Laktoferrin-positives Sekret im Drüsenlumen des komplexen Karzinoms. Obj. x 10. Schaf anti-humanes Laktoferrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. **b** Berliner Blau-negatives Sekret im Drüsenlumen des komplexen Karzinoms. Obj. x 10. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

4.2.1.3. Unverändertes Milchdrüsengewebe

Tabelle 8: Ergebnisse der Berliner Blau-Reaktion, der Turnbolls Blau-Reaktion und der Immunhistologie des unveränderten Milchdrüsengewebes (u.M.) der Fälle

		Anzahl der Hunde, die folgende Häufigkeit an positiven Zellen/Sekret im u.M. aufwiesen:				
		Vereinzelte	Wenige	Einige	Viele	Sehr viele
Berliner Blau-positive(s) ¹ (n = 86)	Makrophagen im Stroma	25	11	16	11	1
	Drüsenepithelien	6	1	2	0	0
	Makrophagen im Drüsenlumen	6	2	1	0	0
	Sekret im Drüsenlumen	18	1	6	1	0
Turnbolls Blau-positive(s) (n = 50) ²	Zellen und/oder Sekret	0	0	0	0	0
Laktoferrin-positives (n = 24) ³	Sekret im Drüsenlumen	1	0	0	0	0

Legende s. nächste Seite

Legende Tabelle 8:

¹: bei Makrophagen: Hämosiderin, bei Drüsenepithelien und Sekret im Drüsenlumen: Hämosiderin oder Ferritin (s. Kapitel 5.1.1.); ²: Es wurden als Stichprobe 50 unveränderte Milchdrüsenschnitte der Fälle mit der Turnbills Blau-Reaktion gefärbt; ³: Es wurden als Stichprobe 24 unveränderte Milchdrüsenschnitte der Fälle immunhistologisch auf Laktoferrin untersucht.

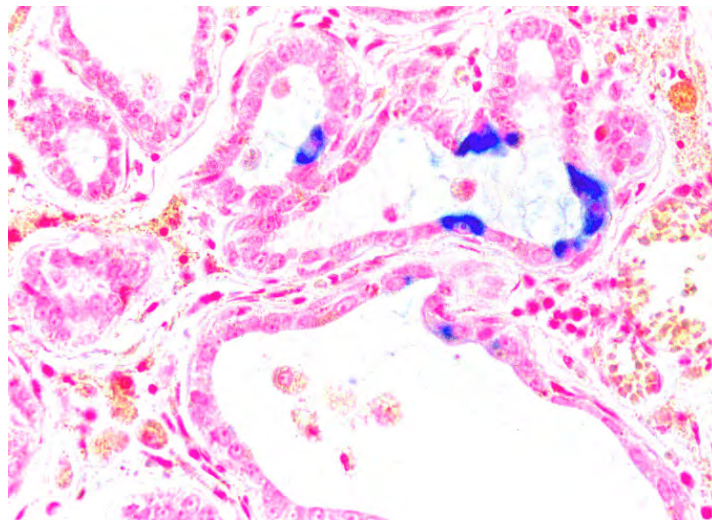


Abbildung 21: Berliner Blau-positive Drüsenepithelien (Hämosiderin oder Ferritin, s. Kapitel 5.1.1.) in einer unveränderten caninen Milchdrüse. Obj. x 20. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

4.2.2. Histologische Befunde der Kontrollen

(Hunde ohne Mammatumoren)

4.2.2.1. *Lymphknoten und Milz*

Da bei der Auswertung der Befunde kein signifikanter Unterschied zwischen Lymphknoten unterschiedlicher Körperseite nachgewiesen werden konnte, werden die Befunde in der folgenden Tabelle 9 nicht nach Körperseite getrennt aufgeführt.

Tabelle 9: Ergebnisse der Berliner Blau-Reaktion, der H.E.-Färbung, der Turnbulls Blau-Reaktion und der Immunhistologie der Lymphknoten¹ und Milzen der Kontrollen

		Anzahl der				
		Oberfl. Leistenl.	Mittleren Darmbeinl.	Achsell.	Kehlgangsl.	Milz
Hämosiderosegrad (Lymphknoten: n = 655, Milz: n = 99)	0 %	62	55	47	46	24
	0,1 %	38	42	48	30	21
	1 %	22	15	22	13	13
	10 %	20	19	18	4	17
	20 %	5	10	11	2	7
	30 %	11	15	9	2	7
	40 %	5	6	9	1	6
	50 %	4	10	9	1	3
	60 %	3	3	6	1	0
	70 %	1	10	5	0	1
	80 %	1	8	2	0	0
	90 %	2	0	2	0	0
Hämosiderinhaltiges Bindegewebe ² (Lymphknoten: n = 655, Milz: n = 99)		10	24	13	4	4
BBn-pigmenthaltige Makrophagen (Lymphknoten: n = 655, Milz: n = 99)		44	14	28	62	0
Neoplasie ³ (Lymphknoten: n = 655, Milz: n = 99)		9	15	14	6	9
Weitere Veränderungen ⁴ (Lymphknoten: n = 655, Milz: n = 99)		31	53	48	45	32
Neutrophile Granulozyten (Lymphknoten: n = 655, Milz: n = 99)		6	5	3	1	0
Turnbulls Blau-Reaktion ⁵ (Lymphknoten: n = 300, Milz: n = 25)		0	0	0	0	0
Laktoferrin-positive Makrophagen ⁶ (Lymphknoten: n = 56, Milz: n = 4)		1	4	3	1	3
Laktoferrin-positive neutrophile Granulozyten (Lymphknoten: n = 14) ⁷		0	0	0	0	-

Legende s. nächste Seite

Legende Tabelle 9:

Oberfl.: oberflächliche; -l.: Lymphknoten; ¹: Aus nicht selbst beeinflussbaren Gründen konnten nicht für alle Hunde der Kontrollen die Lymphknoten beider Körperseiten untersucht werden; ²: s. Kapitel 3.2.5.1.1.; ³: s. Kapitel 3.2.5.4., es traten Lymphosarkom, Pankreaskarzinom, blastoider Rundzelltumor, maligne Histiozytose, Hämangiosarkom und Übergangszellkarzinom auf; ⁴: Es traten follikuläre Hyperplasie, Sinushistiozytose, Hyperämie, Erythrozyten im Sinus, Hyperämie mit Erythrozyten in Sinus und Gewebe, Sinusödem und extramedulläre Hämatopoese auf; ⁵: Es wurden als Stichprobe 300 Lymphknoten und 25 Milzen der Kontrollen mit der Turnbills Blau-Reaktion gefärbt; ⁶: Es wurden als Stichprobe 56 Lymphknoten und 4 Milzen der Kontrollen immunhistologisch auf Laktoferrin untersucht; ⁷: Aufgrund Materialmangels wurden nur 14 von 15 Lymphknoten mit neutrophilen Granulozyten immunhistologisch auf Laktoferrin untersucht.

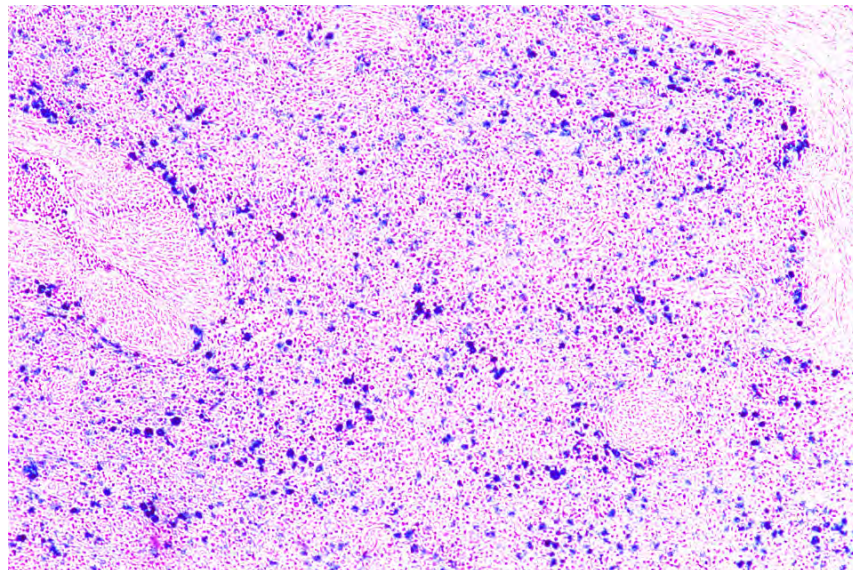


Abbildung 22: Hämosiderinhaltige Makrophagen in der roten Pulpa einer caninen Milz. Obj. x 10. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

4.2.2.2. BBn-Pigment

Zur Identifikation des intrazellulären, Berliner Blau-negativen, braunen Pigments in Makrophagen (BBn-Pigment, s. Abbildung 23) wurden canine Lymphknoten als Stichprobe in der Fluoreszenzmikroskopie (n = 30), der Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion (n = 10), nach Bleichen (n = 10) und in der Long Ziehl-Neelsen-Reaktion (n = 10) untersucht (s. Kapitel 3.2.2. und 3.2.3.). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11 und 12 aufgeführt. Tabelle 10 zeigt die in diesen Färbungen zu erwartenden Reaktionen für Aposiderin, Lipofusazine und Melanin (s. Kapitel 2.2.4.).

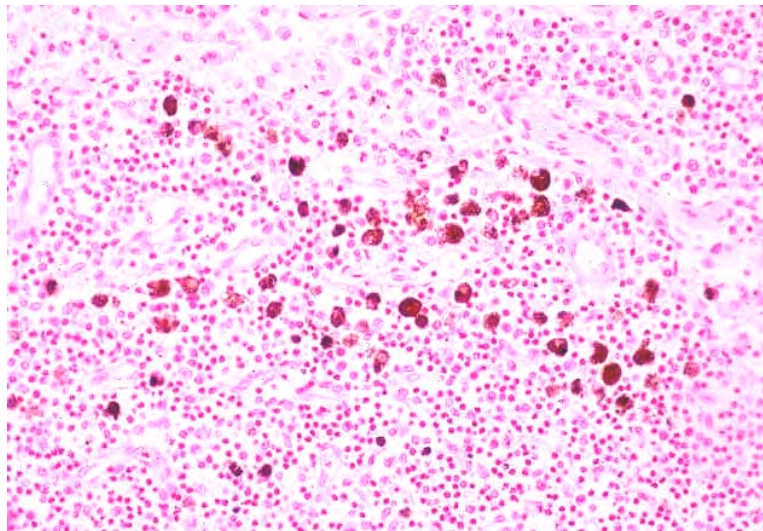


Abbildung 23: BBn-Pigment in Makrophagen des Marksinus eines caninen Lymphknotens (entspricht Abbildung 4, Kapitel 2.2.4.1.). Obj. x 20. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

Tabelle 10: Ausgewählte Eigenschaften von BBn-Pigmenten

Eigenschaft	BBn-Pigment		
	Aposiderin	Lipofusazine	Melanin
Autofluoreszenz	- / (+)	- / +	-
Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion	-	(-) / +	+
Bleichbarkeit mit Kaliumpermanganat (-: nicht bleichbar; +: bleichbar)	-	- / +	+
Long Ziehl-Neelsen-Reaktion (Säurefestigkeit)	-	(-) / +	- / +

-: negativ; (-): selten negativ; +: positiv; (+): selten positiv

Tabelle 11: Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie von Lymphknoten mit BBn-Pigment der Kontrollen

Untersuchtes Pigment	Autofluoreszenz	
	positiv ¹	negativ
BBn-Pigment (n = 30)	0	30
Kontrolle für Aposiderin ² (n = 1)	0	1
Positivkontrolle ³ (n = 1)	1	0

¹: gelbe bis orangefarbene Autofluoreszenz bei einer Anregung mit 450 - 490 nm und einem Sperrfilter von 510 nm; ²: s. Kapitel 3.2.2.5.; ³: Kleinhirn eines 17 Jahre alten Warmblut-Wallachs mit altersbedingter Lipofuszinablagerung in den Purkinje-Zellen (Tagebuchnummer S835/08).

Tabelle 12: Ergebnisse der Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion, des Bleichens und der Long Ziehl-Neelsen-Reaktion von Lymphknoten mit BBn-Pigment der Kontrollen

BBn-Pigment, Schnitt Nr.	Histologische Färbung			Identität
	Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion	Bleichbarkeit mit Kaliumpermanganat (-: nicht bleichbar; +: bleichbar)	Long Ziehl-Neelsen-Reaktion	
1	-	-	-	A./Li.
2	-	+	-	Li.
3	-	+	-	Li.
4	-	+	-	Li.
5	-	+	+	Li.
6	-	+	-	Li.
7	-	+	-	Li.
8	-	+	-	Li.
9	-	-	-	A./Li.
10	-	+	-	Li.
Kontrolle für Aposiderin ¹	-	-	-	A.
Positivkontrolle ²	+	-	+	Li.

A.: Aposiderin; Li.: Lipofuszin; ¹: s. Kapitel 3.2.2.5.; ²: Kleinhirn eines 17 Jahre alten Warmblut-Wallachs mit altersbedingter Lipofuszinablagerung in den Purkinje-Zellen (Tagebuchnummer S835/08).

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie, der Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion, des Bleichens und der Long Ziehl-Neelsen-Reaktion sprechen dafür, dass das BBn-Pigment in Makrophagen caniner Lymphknoten Aposiderin und/oder Lipofuszin war. Es trat BBn-Pigment auf, das in allen 4 Untersuchungen negative Reaktionen zeigte. Hierbei handelte es sich um intravital entstandenes Aposiderin oder um Lipofuszin. Zudem trat bleichbares BBn-Pigment mit einer negativen Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion und unterschiedlicher Long Ziehl-Neelsen-Reaktion auf. Hierbei handelte es sich um Lipofuszin (s. auch Kapitel 5.1.3).

4.3. Ergebnisse der statistischen Auswertung

Zur statistischen Auswertung lagen für die Fälle (Hunde mit Mammatumoren) Fragebogendaten und histologische Befunde der oberflächlichen Leistenlymphknoten, der Mammatumoren und des unveränderten Milchdrüsengewebes vor. Für die Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) lagen Fragebogendaten und histologische Befunde der oberflächlichen Leistenlymphknoten, der mittleren Darmbeinlymphknoten, der Achsellymphknoten, der Kehlganglymphknoten und der Milz vor (s. Kapitel 3.1. sowie Tabelle 13). Dabei konnten aus nicht selbst beeinflussbaren Gründen nicht für alle Hunde der Kontrollen die Lymphknoten beider Körperseiten untersucht werden. Alle Daten der Fälle und Kontrollen sind in Kapitel 9.2. aufgeführt.

Tabelle 13: Übersicht zur Datenstruktur der Fälle und Kontrollen

Gruppe	Fortlaufende Nummer	Fragebogendaten	Lymphknoten		Milz	Mamma- tumoren	U. Milchdrüsen- gewebe
			Le.	Da., Ac., Ke.			
1	1	D	D			D	D
1	2	D	D			D	D
1	3	D	D			D	D
Etc.	Etc.	D	D			D	D
2	1	D	D	D	D		
2	2	D	D	D	D		
2	3	D	D	D	D		
Etc.	Etc.	D	D	D	D		

U.: unverändertes; Le.: oberflächliche Leistenlymphknoten; Da.: mittlere Darmbeinlymphknoten; Ac.: Achsellymphknoten; Ke.: Kehlganglymphknoten; Gruppe 1: Fälle = Hunde mit Mammatumoren; Gruppe 2: Kontrollen = Hunde ohne Mammatumoren; D: Daten vorhanden.

4.3.1. Altersstruktur der Fälle und Kontrollen

Die Altersstruktur der Fälle und Kontrollen ist in Tabelle 14 sowie Abbildung 24 dargestellt. Die Gruppe „Fälle“ umfasst alle 100 untersuchten Hunde mit Mammatumoren und besteht aus weiblichen Hunden ab einem Alter von 4 Jahren. Die Gruppe „Kontrollen 1“ umfasst alle untersuchten Hunde ohne Mammatumoren. Sie besteht aus juvenilen und adulten Rüden und Hündinnen. Dabei war nur bei 94 der 100 untersuchten Hunde das genaue Alter bekannt. Die Gruppe „Kontrollen 2“ umfasst nur weibliche Hunde der Kontrollen ab einem Alter von 4 Jahren. Sie wurde zur Angleichung des Geschlechts und der Altersstruktur der Kontrollen mit dem Geschlecht und der Altersstruktur der Fälle gebildet. Diese Gruppe umfasst 30 Hunde.

Tabelle 14: Altersstruktur der Fälle und Kontrollen

Alter in Jahren	Fälle (n = 100)	Kontrollen 1 (n = 94)	Kontrollen 2 (n = 30)
Minimum	4	0,1	4
1. Quartil	7	0,4	6
Median	9	6	8
3. Quartil	11	9	10
Maximum	15	15	13

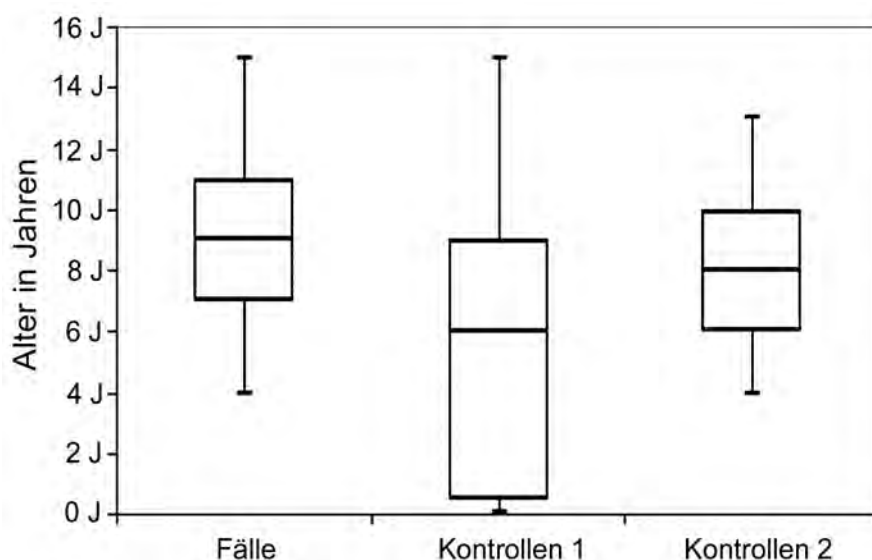


Abbildung 24: Alter in Jahren der Fälle und Kontrollen im Box-and-Whisker-Plot.

4.3.2. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Ausbildung von Mammatumoren in der Milchdrüse

Bei 100 weiblichen Fällen (Hunde mit Mammatumoren) ab einem Alter von 4 Jahren und 30 weiblichen Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) ab einem Alter von 4 Jahren wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit der Ausbildung von Mammatumoren in der Milchdrüse des selben Hundes geprüft (s. Tabellen 15 und 16 sowie Abbildungen 25 und 26). Bei den Fällen lag pro Hund immer nur ein oberflächlicher Leistenlymphknoten zur Untersuchung vor. Wenn bei den Kontrollen beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte kein signifikanter ($p = 0,712$) Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten bei weiblichen Hunden mit und weiblichen Hunden ohne Mammatumoren nachgewiesen werden.

Tabelle 15: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in % bei weiblichen Hunden ab einem Alter von 4 Jahren mit und ohne Mammatumoren

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lymphknoten von Hunden mit und ohne Mammatumor			
	Mammatumor		Kein Mammatumor	
	n	%	n	%
0	12	12	3	10
0,1	18	18	8	26,7
1	15	15	4	13,4
10	17	17	5	16,7
20	11	11	3	10
30	11	11	2	6,7
40	5	5	1	3,3
50	4	4	1	3,3
60	4	4	1	3,3
70	3	3	0	0
80	0	0	1	3,3
90	0	0	1	3,3
Summe	100	100	30	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

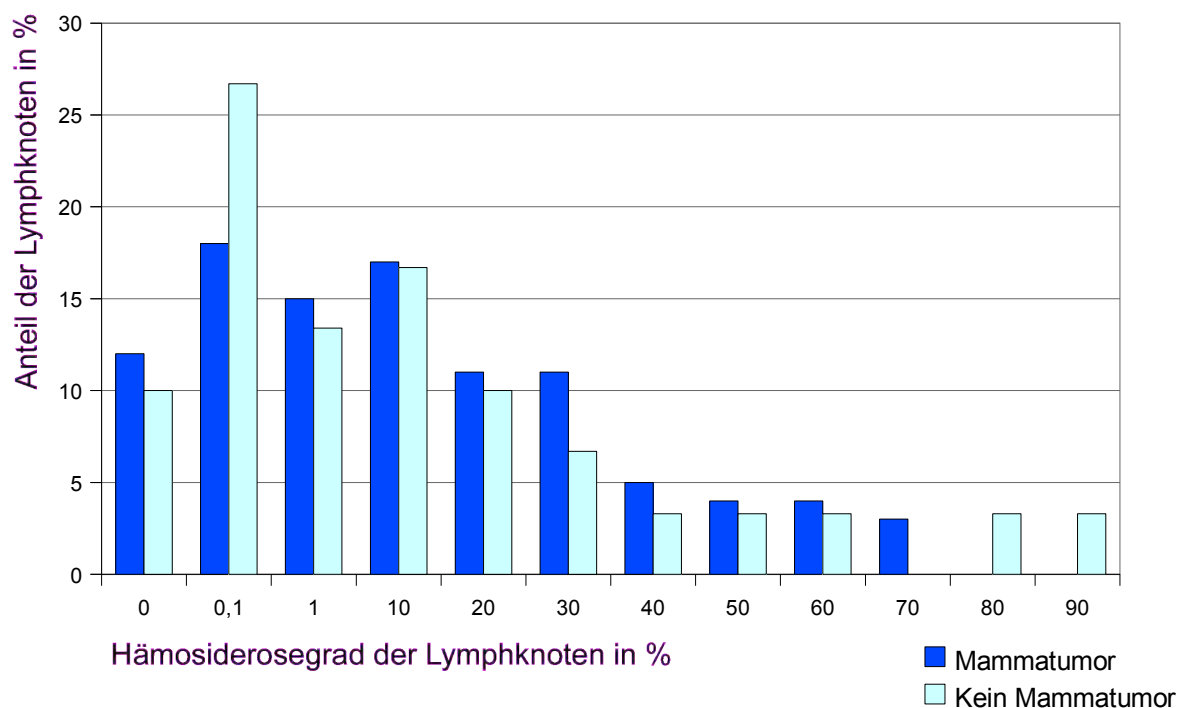


Abbildung 25: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in % bei weiblichen Hunden ab einem Alter von 4 Jahren mit und ohne Mammatumoren.

Tabelle 16: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in % bei weiblichen Hunden ab einem Alter von 4 Jahren mit und ohne Mammatumoren

Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in %	Mammatumors (n = 100)	Kein Mammatumors (n = 30)
Minimum	0	0
1.Quartil	0,1	0,1
Median	10	1-10
3. Quartil	30	20
Maximum	70	90

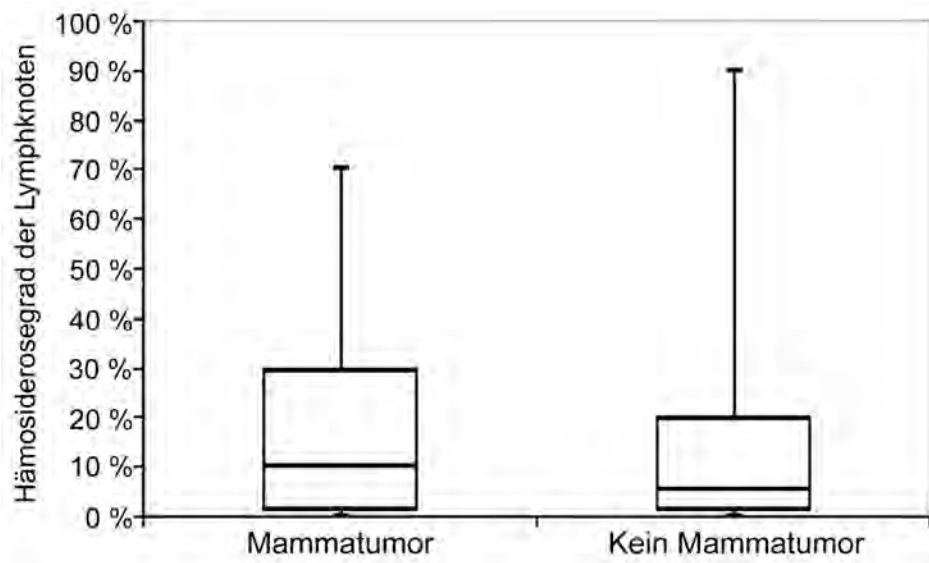


Abbildung 26: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in % bei weiblichen Hunden ab einem Alter von 4 Jahren mit und ohne Mammatumoren im Box-and-Whisker-Plot.

4.3.3. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Geschlecht der Hunde

Bei 100 Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Geschlecht der Hunde geprüft (s. Tabellen 17 und 18 sowie Abbildungen 27 und 28). Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Im Kruskal-Wallis-Test konnte knapp kein signifikanter ($p = 0,088$) Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten bei 100 Hunden unterschiedlichen Geschlechts nachgewiesen werden.

Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte keine statistisch signifikante Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Geschlecht bei 32 weiblich-intakten und 36 männlich-intakten Kontrollen ($p = 0,553$) sowie bei 18 weiblich-kastrierten und 14 männlich-kastrierten Kontrollen ($p = 0,406$) gezeigt werden.

Tabelle 17: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % bei Hunden unterschiedlichen Geschlechts

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lymphknoten von Hunden unterschiedlichen Geschlechts							
	Weiblich-intakt		Weiblich-kastriert		Männlich-intakt		Männlich-kastriert	
	n	%	n	%	n	%	n	%
0	12	37,4	3	16,6	15	41,7	5	35,8
0,1	10	31,2	4	22,1	11	30,5	2	14,3
1	3	9,4	2	11,1	5	13,8	2	14,3
10	0	0	5	27,8	2	5,6	2	14,3
20	2	6,2	1	5,6	0	0	1	7,1
30	2	6,2	1	5,6	2	5,6	0	0
40	1	3,2	0	0	1	2,8	0	0
50	0	0	1	5,6	0	0	1	7,1
60	1	3,2	0	0	0	0	1	7,1
70	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	1	5,6	0	0	0	0
90	1	3,2	0	0	0	0	0	0
Summe	32	100	18	100	36	100	14	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

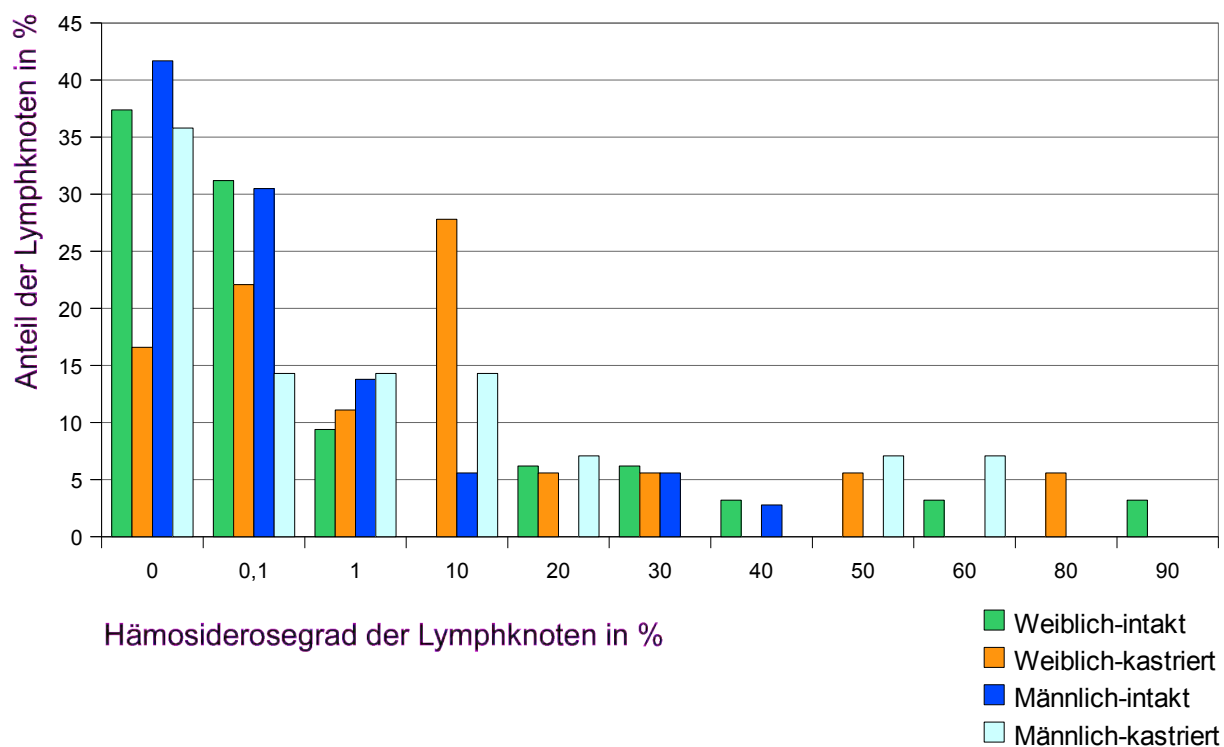


Abbildung 27: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % bei Hunden unterschiedlichen Geschlechts.

Tabelle 18: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in % bei Hunden unterschiedlichen Geschlechts

Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in %	Lymphknoten von Hunden unterschiedlichen Geschlechts			
	Weiblich-intakt	Weiblich-kastriert	Männlich-intakt	Männlich-kastriert
Minimum	0	0	0	0
1.Quartil	0	0,1	0	0
Median	0,1	1-10	0,1	0,1-1
3. Quartil	1	10	1	10
Maximum	90	80	40	60

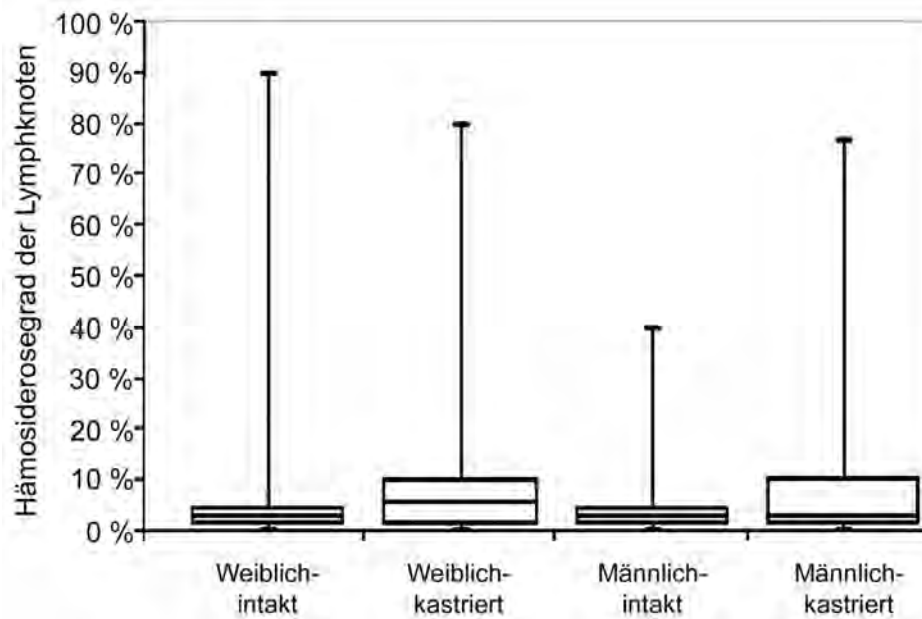


Abbildung 28: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in % bei Hunden unterschiedlichen Geschlechts im Box-and-Whisker-Plot.

4.3.4. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit einer Kastration der Hunde

Bei 23 adulten weiblich-intakten und 16 adulten weiblich-kastrierten Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit einer Kastration des selben Hundes im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabellen 17 und 18 sowie Abbildungen 27 und 28). Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte kein signifikanter ($p = 0,33$) Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten bei adulten weiblich-intakten und adulten weiblich-kastrierten Hunden nachgewiesen werden.

Entsprechendes ergab die Prüfung auf Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit einer Kastration des selben Hundes im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test bei 23 adulten männlich-intakten und 14 adulten männlich-kastrierten Kontrollen ($p = 0,936$).

4.3.5. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Geschlechtsreife der Hunde

Bei 100 Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit der Geschlechtsreife der Hunde im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabellen 19 und 20 sowie Abbildungen 29 und 30). Die Geschlechtsreife wurde anhand des Alters und einer vorberichtlich genannten Läufigkeit festgelegt. Juvenile Hunde waren maximal 4 Monate alt oder vorberichtlich noch nicht läufig gewesen. Adulte Hunde waren mindestens 1,5 Jahre alt oder vorberichtlich bereits läufig gewesen. Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt.

Tabelle 19: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in % bei juvenilen und adulten Hunden

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lymphknoten von juvenilen und adulten Hunden			
	Juvenil		Adult	
	n	%	n	%
0	21	87,5	14	18,4
0,1	3	12,5	24	31,6
1	0	0	12	15,8
10	0	0	9	11,9
20	0	0	4	5,3
30	0	0	5	6,6
40	0	0	2	2,6
50	0	0	2	2,6
60	0	0	2	2,6
70	0	0	0	0
80	0	0	1	1,3
90	0	0	1	1,3
Summe	24	100	76	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

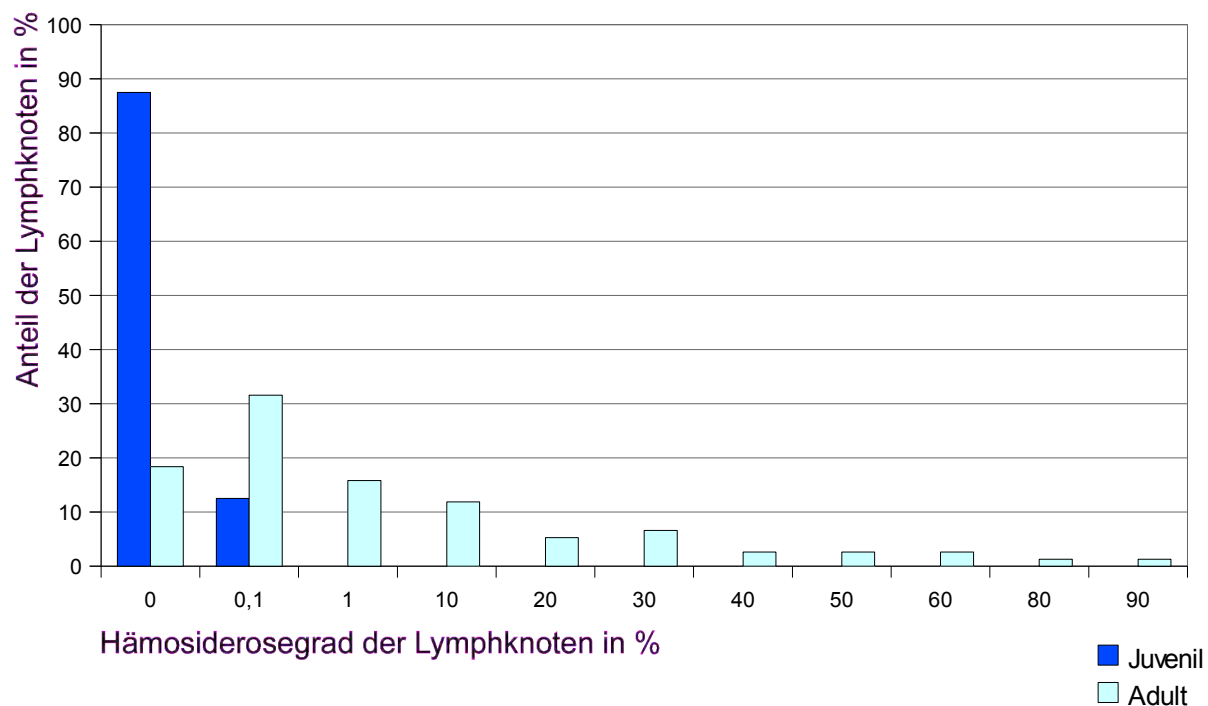


Abbildung 29: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % bei juvenilen und adulten Hunden.

Tabelle 20: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % bei juvenilen und adulten Hunden

Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in %	Geschlechtsreife der Hunde	
	Juvenil (n = 24)	Adult (n = 76)
Minimum	0	0
1.Quartil	0	0,1
Median	0	0,1-1
3. Quartil	0	10
Maximum	0,1	90

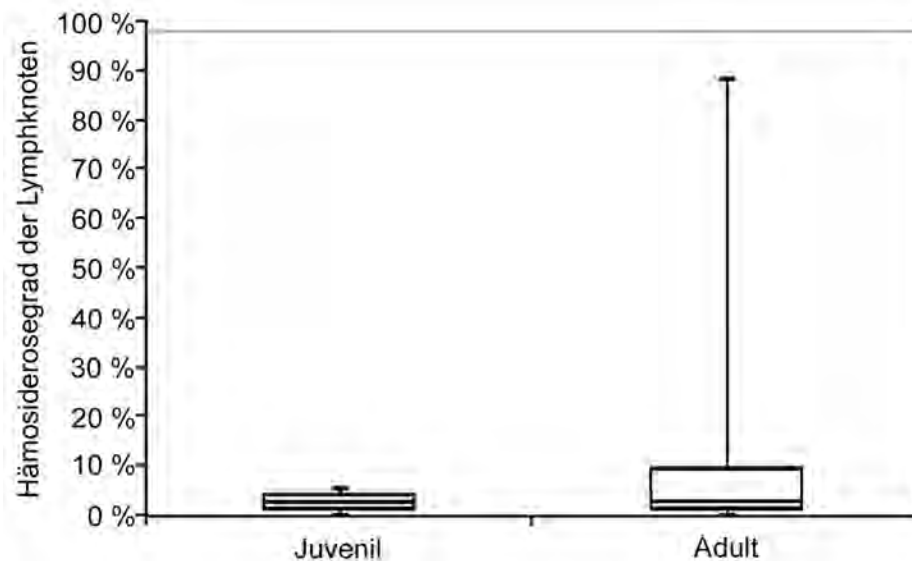


Abbildung 30: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % bei juvenilen und adulten Hunden im Box-and-Whisker-Plot.

Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte ein signifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten bei juvenilen und adulten Hunden nachgewiesen werden. Dabei zeigten adulte Hunde deutlich stärkere Hämosiderinspeicherung.

4.3.6. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten und Milzen mit dem Alter der Hunde

Bei Hunden der Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades in 373 Lymphknoten und 93 Milzen mit dem Alter der Hunde im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten geprüft. Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Das Alter der Hunde lag zwischen 0,08 und 15 Jahren. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ergab eine statistisch signifikante (alle $p < 0,0001$) positive Korrelation ($r_s = 0,601, 0,700, 0,611, 0,484, 0,663$) zwischen dem Hämosiderosegrad der Lymphknoten oder der Milzen und dem Alter der Hunde (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: Korrelation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten oder Milzen und dem Alter der Hunde im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten

Lymphknoten/Milz	Spearman- Rangkorrelationskoeffizient (r_s)	p-Wert
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 94)	0,601	< 0,0001
Mittlere Darmbeinlymphknoten (n = 92)	0,700	
Achsellymphknoten (n = 93)	0,611	
Kehlgangslymphknoten (n = 94)	0,484	
Milz (n = 93)	0,663	

4.3.7. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Regelmäßigkeit der Läufigkeit der Hunde

Da bei den Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) zu wenig Daten vorlagen, wurde bei 35 weiblich-intakten Fälle (Hunde mit Mammatumoren) eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit einer regelmäßigen Läufigkeit der Hunde im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabelle 22 sowie Abbildung 31). Es lag pro Hund immer nur ein oberflächlicher Leistenlymphknoten zur Untersuchung vor. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte kein signifikanter ($p = 0,563$) Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten bei weiblich-intakten Hunden mit regelmäßiger und weiblich-intakten Hunden mit unregelmäßiger Läufigkeit nachgewiesen werden.

Tabelle 22: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Fälle in % und die Regelmäßigkeit der Läufigkeit der untersuchten Hunde

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lymphknoten von Hunden mit regelmäßiger und unregelmäßiger Läufigkeit			
	Regelmäßige Läufigkeit		Unregelmäßige Läufigkeit	
	n	%	n	%
0	4	12,9	1	25
0,1	6	19,3	0	0
1	8	25,8	1	25
10	4	12,9	0	0
20	2	6,5	0	0
30	4	12,9	0	0
40	0	0	0	0
50	0	0	0	0
60	1	3,2	2	50
70	2	6,5	0	0
80	0	0	0	0
90	0	0	0	0
Summe	31	100	4	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

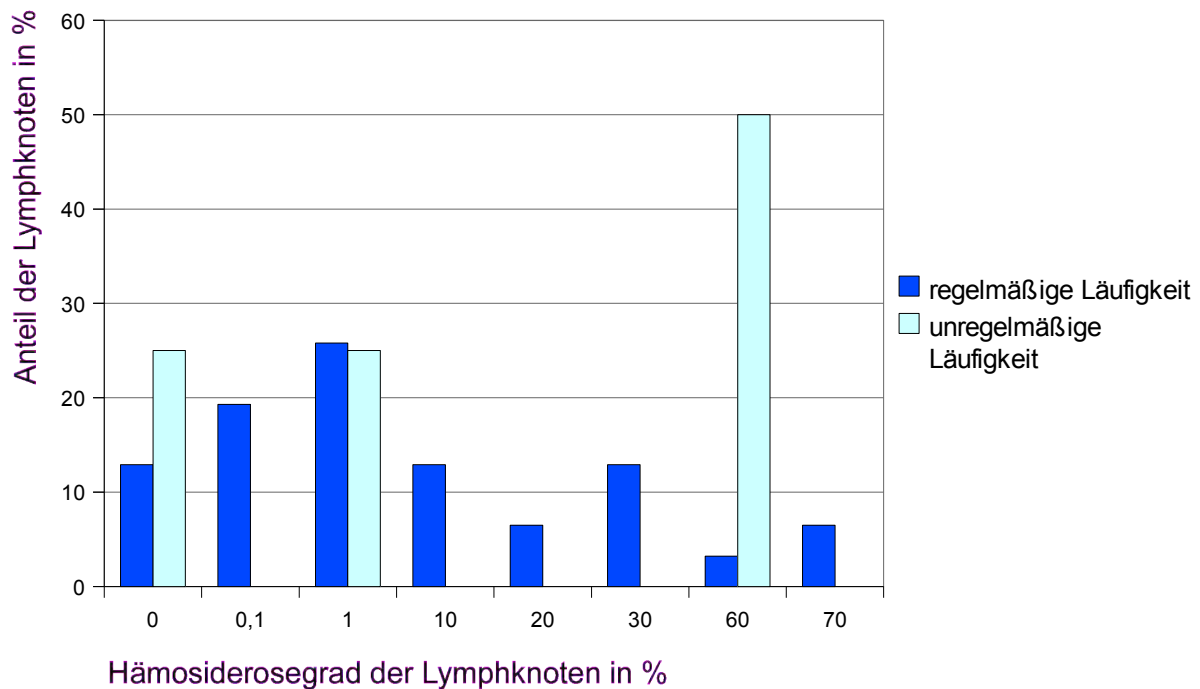


Abbildung 31: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Fälle in % und die Regelmäßigkeit der Läufigkeit der untersuchten Hunde.

Das Alter der regelmäßig läufigen Hunde lag zwischen 5 und 15 Jahren, das Alter der unregelmäßig läufigen Hunde lag zwischen 10 und 12 Jahren. Eine statistisch signifikante Assoziation der Regelmäßigkeit einer Läufigkeit mit dem Alter der Hunde konnte im t-Test nicht nachgewiesen werden ($p = 0,502$).

4.3.8. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Zeit seit der letzten Läufigkeit der Hunde

Bei 8 weiblich-intakten Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit der Zeit seit der letzten Läufigkeit im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten geprüft. Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per

Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Die Zeit seit der letzten Läufigkeit lag zwischen 0 und 12 Wochen.

Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ergab keine statistisch signifikante ($p = 0,953$) Korrelation ($r_s = 0,025$) zwischen dem Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten und der Zeit seit der letzten Läufigkeit.

4.3.9. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Auftreten von Scheinträchtigkeiten der Hunde

Da bei den Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) zu wenig Daten vorlagen, wurde bei 61 weiblich-intakten Fällen (Hunde mit Mammatumoren) eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Auftreten einer Scheinträchtigkeit bei den untersuchten Hunden im Kruskal-Wallis-Test geprüft (s. Tabelle 23 sowie Abbildung 32). Es lag pro Hund immer nur ein oberflächlicher Leistenlymphknoten zur Untersuchung vor. Im Kruskal-Wallis-Test konnte kein signifikanter ($p = 0,361$) Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten bei weiblich-intakten Hunden mit regelmäßiger, unregelmäßiger oder keiner Scheinträchtigkeit nachgewiesen werden.

Tabelle 23: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Fälle in % und Auftreten einer Scheinträchtigkeit bei den untersuchten Hunde

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lymphknoten von Hunden mit regelmäßiger, unregelmäßiger und keiner					
	Regelmäßige			Scheinträchtigkeit		
	Scheinträchtigkeit			Scheinträchtigkeit		
	Keine		Keine		Keine	
	n	%	n	%	n	%
0	1	6,3	2	13,3	7	23,4
0,1	5	31,3	2	13,3	4	13,3
1	4	25	3	20	5	16,7
10	2	12,5	1	6,7	5	16,7
20	0	0	0	0	4	13,3
30	3	18,7	1	6,7	2	6,7
40	0	0	0	0	1	3,3
50	0	0	3	20	0	0
60	1	6,3	2	13,3	1	3,3
70	0	0	1	6,7	1	3,3
80	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	0
Summe	16	100	15	100	30	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

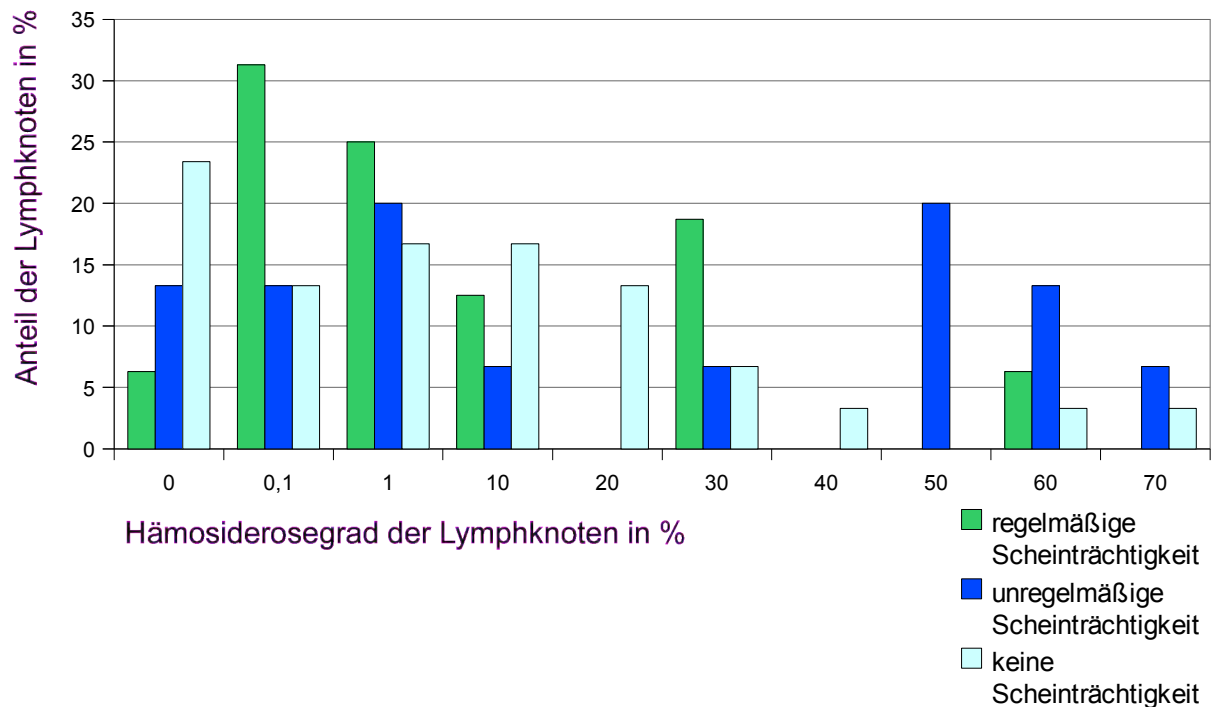


Abbildung 32: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Fälle in % und Auftreten einer Scheinträchtigkeit bei den untersuchten Hunde.

Das Alter der regelmäßig scheinträchtigen Hunde lag zwischen 6 und 15 Jahren, das der unregelmäßig scheinträchtigen zwischen 6 und 13 Jahren und das der nie scheinträchtigen zwischen 5 und 15 Jahren. Eine statistisch signifikante Assoziation der Regelmäßigkeit einer Scheinträchtigkeit mit dem Alter der Hunde konnte in der einfaktoriellen Varianzanalyse nicht nachgewiesen werden ($p = 0,116$).

4.3.10. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen im Einzugsgebiet der Lymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten

Bei 63 Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Auftreten von Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen im Einzugsgebiet der Lymphknoten,

die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten, im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabellen 24 und 25 sowie Abbildungen 33 und 34). Es traten Dermatitis, Verletzungen, Laparotomie und Mammektomie auf. Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Hunde mit Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen im Einzugsgebiet der Lymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten, zeigten stärkere Hämosiderinspeicherung in oberflächlichen Leistenlymphknoten als Hunde ohne Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen im Einzugsgebiet. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test war dies jedoch knapp nicht signifikant ($p = 0,092$). Bei der Untersuchung einer größeren Datenmenge könnte sich eine signifikante Assoziation zeigen.

Tabelle 24: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen (EVO) im Einzugsgebiet der Lymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lymphknoten von Hunden mit und ohne EVO			
	EVO		Keine EVO	
	n	%	n	%
0	11	25	10	52,6
0,1	12	27,3	3	15,7
1	6	13,6	2	10,5
10	7	15,9	1	5,3
20	2	4,5	1	5,3
30	1	2,3	1	5,3
40	1	2,3	0	0
50	2	4,5	0	0
60	1	2,3	1	5,3
70	0	0	0	0
80	1	2,3	0	0
90	0	0	0	0
Summe	44	100	19	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

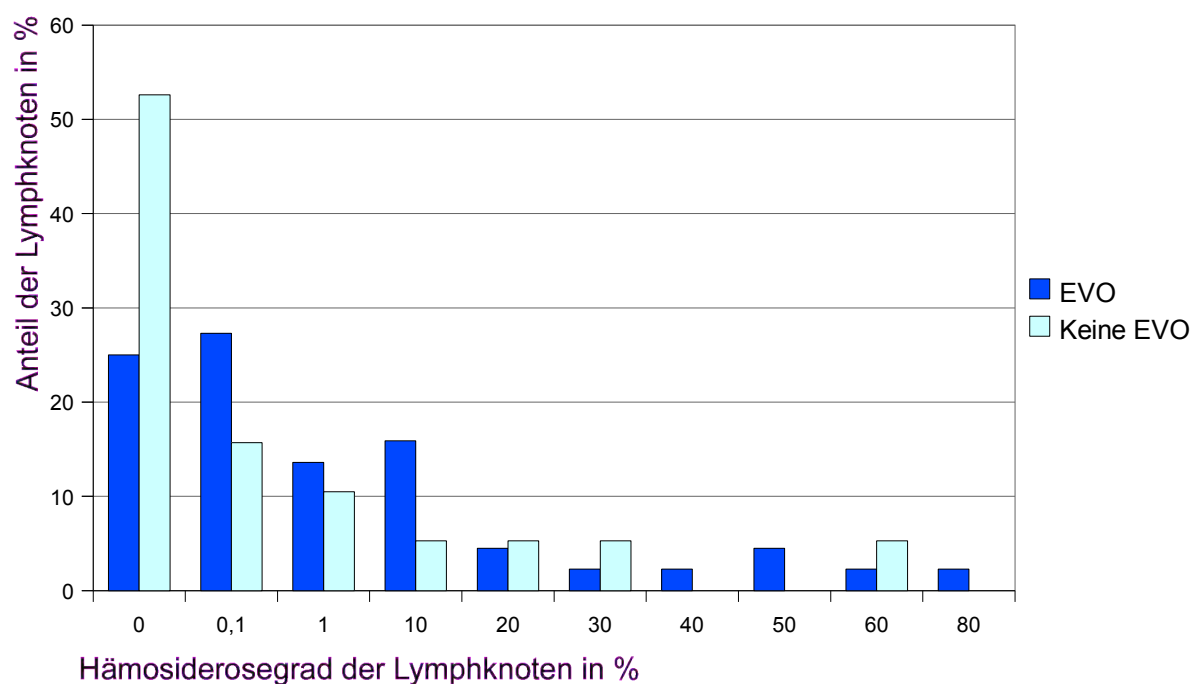


Abbildung 33: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und EVO.

Tabelle 25: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen (EVO) im Einzugsgebiet der Lymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten

Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in %	EVO (n = 44)	Keine EVO (n = 19)
Minimum	0	0
1.Quartil	0 - 0,1	0
Median	0,1	0
3. Quartil	10	1
Maximum	80	60

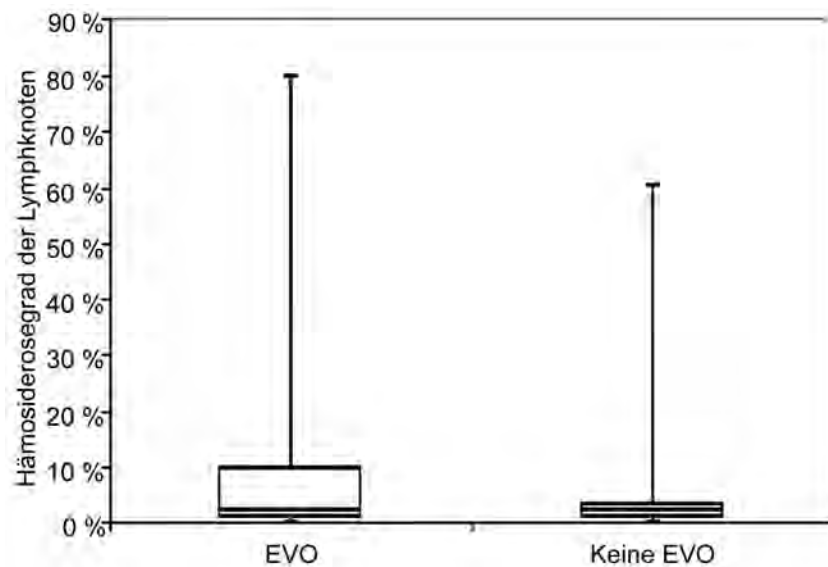


Abbildung 34: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen (EVO) im Einzugsgebiet der Lymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten, im Box-and-Whisker-Plot.

4.3.11. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Erhalt einer Bluttransfusion

Bei 28 Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) war bekannt, ob sie jemals eine Bluttransfusion erhalten hatten oder nicht. Bei diesen Hunden wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Erhalt einer Bluttransfusion im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabelle 26 sowie Abbildung 35). Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Die Zeit zwischen Bluttransfusion und Tod betrug einen halben Tag (2 Hunde), einen Tag (ein Hund), 4 Tage (ein Hund), 6 Tage (ein Hund) oder 14 Tage (2 Hunde). Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte kein signifikanter ($p = 0,206$) Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten bei Hunden, die eine

Bluttransfusion erhielten und solchen, die nie eine erhielten, nachgewiesen werden.

Tabelle 26: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und Erhalt einer Bluttransfusion

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lymphknoten von Hunden, die eine Bluttransfusion erhielten und von Hunden, die nie eine erhielten			
	Bluttransfusion		Keine Bluttransfusion	
	n	%	n	%
0	2	28,6	11	52,4
0,1	2	28,6	3	14,3
1	0	0	3	14,3
10	1	14,2	2	9,5
20	0	0	2	9,5
30	2	28,6	0	0
40	0	0	0	0
50	0	0	0	0
60	0	0	0	0
70	0	0	0	0
80	0	0	0	0
90	0	0	0	0
Summe	7	100	21	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

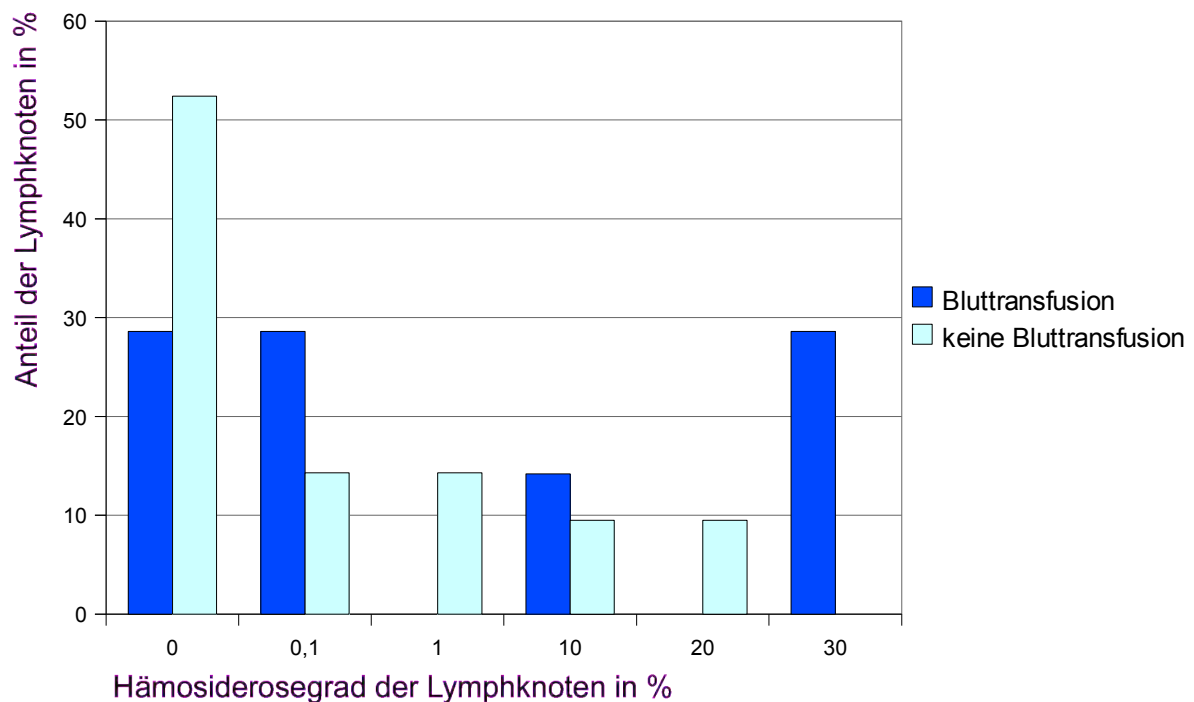


Abbildung 35: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und Erhalt einer Bluttransfusion.

4.3.12. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Todesart der Hunde

Bei 93 Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit der Todesart der Hunde im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabelle 27 sowie Abbildung 36). Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte kein signifikanter ($p = 0,272$) Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten bei euthanasierten und verstorbenen Hunden nachgewiesen werden.

Tabelle 27: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und die Todesart der Hunde

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lymphknoten von Hunden, die verstorben sind oder euthanasiert wurden			
	Euthanasie		Exitus	
	n	%	n	%
0	12	24,5	18	40,1
0,1	17	34,6	9	20,6
1	7	14,2	5	11,4
10	2	4,1	7	15,9
20	2	4,1	1	2,4
30	4	8,2	1	2,4
40	2	4,1	0	0
50	1	2,1	1	2,4
60	2	4,1	0	0
70	0	0	0	0
80	0	0	1	2,4
90	0	0	1	2,4
Summe	49	100	44	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

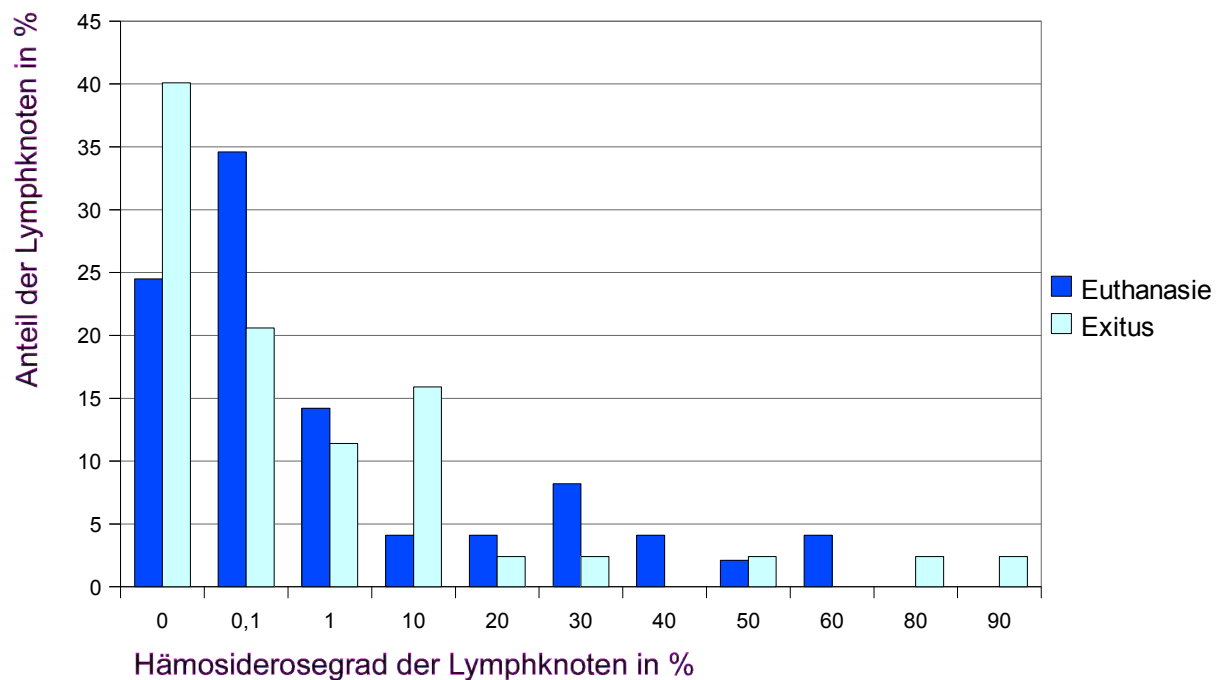


Abbildung 36: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und Todesart der Hunde.

4.3.13. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Frischegrad dieser Lymphknoten

Bei 83 Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Frischegrad dieser Lymphknoten im Kruskal-Wallis-Test geprüft (s. Tabelle 28 sowie Abbildung 37). Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Der Frischegrad wurde in frisch (kein Verwesungsprozess erkennbar), relativ frisch (geringgradige Sulfmethämoglobinbildung im Abdomen), nicht mehr frisch (deutliche Sulfmethämoglobinbildung in verschiedenen Organen) und hochgradig fortgeschrittene postmortale Veränderungen (deutliche Sulfmethämoglobinbildung im gesamten Körper und Verflüssigung der Organe) eingeteilt. Im Kruskal-Wallis-Test

konnte keine signifikante ($p = 0,291$) Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Frischegrad dieser Lymphknoten nachgewiesen werden.

Tabelle 28: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und den Frischegrad dieser Lymphknoten

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lymphknoten von Hunden unterschiedlichen Frischegrades							
	Frisch		Relativ frisch		Nicht mehr frisch		Hgr. postmortale Veränderungen	
	n	%	n	%	n	%	n	%
0	6	28,6	13	38,2	5	31,2	0	0
0,1	5	23,8	9	26,4	6	37,4	1	25
1	3	14,3	5	14,6	1	6,3	0	0
10	3	14,3	2	5,9	1	6,3	0	0
20	0	0	0	0	1	6,3	3	75
30	1	4,8	2	5,9	0	0	0	0
40	2	9,4	0	0	0	0	0	0
50	0	0	1	3	1	6,3	0	0
60	1	4,8	0	0	1	6,3	0	0
70	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	1	3	0	0	0	0
90	0	0	1	3	0	0	0	0
Summe	21	100	34	100	16	100	4	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

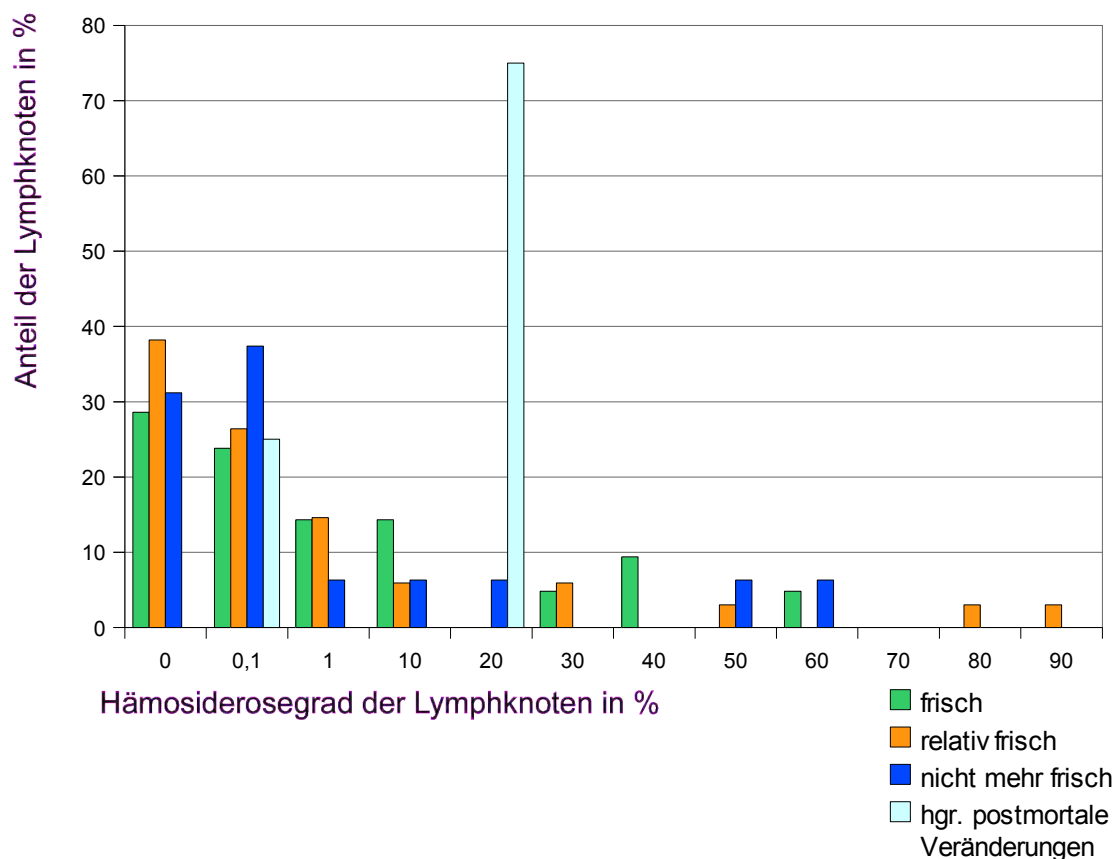


Abbildung 37: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Kontrollen in % und Frischegrad dieser Lymphknoten.

4.3.14. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten mit der Lokalisation der Lymphknoten

Bei Hunden der Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades von 291 Lymphknoten mit ihrer Lokalisation (inguinal, iliacal, axillar) im Körper im Friedman-Rang-Test geprüft (s. Tabelle 29 sowie Abbildung 38). Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Im Friedman-Rang-Test zeigte sich signifikant ($p = 0,001$), dass die oberflächlichen Leistenlymphknoten den geringsten und die mittleren Darmbeinlymphknoten den höchsten Hämosideringehalt aufwiesen.

Tabelle 29: Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten der Kontrollen mit der Lokalisation der Lymphknoten im Körper im Friedman-Rang-Test

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Lokalisation der Lymphknoten			p-Wert
	Inguinal (n = 97)	Iliacal (n = 97)	Axillar (n = 97)	
Minimum	0	0	0	0,001
1.Quartil	0	0	0,1	
Median	0,1	0,1	1,0	
3. Quartil	10	30	20	
Maximum	90	80	90	
Mittlere Rangzahl	163,5	210,5	208,0	

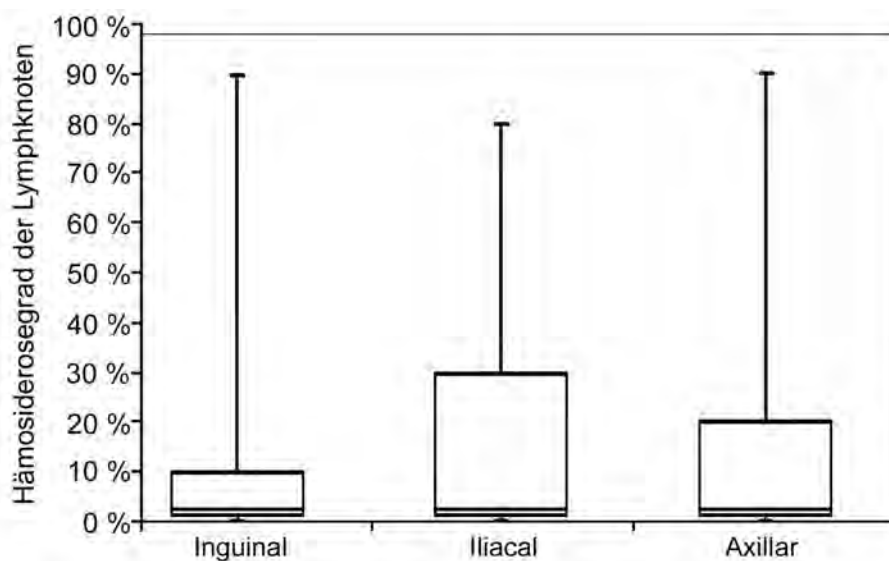


Abbildung 38: Hämosiderosegrad der Lymphknoten der Kontrollen in % und Lokalisation dieser Lymphknoten im Box-and-Whisker-Plot.

4.3.15. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Hämosiderosegrad weiterer untersuchter Lymphknoten

Bei den Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurden eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Hämosiderosegrad der Achsellymphknoten und mit dem Hämosiderosegrad der mittleren Darmbeinlymphknoten im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten geprüft. Es wurden nur Lymphknoten gewählt, die bei dem selben Hund auftraten. Um einen Einfluss des gemeinsamen tributären Gebietes der Lymphknoten zu prüfen wurden nur Lymphknoten der selben Körperseite miteinander verglichen. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ergab signifikant ($p < 0,0001$) eine positive Korrelation zwischen dem Hämosiderosegrad von 81 linken oberflächlichen Leistenlymphknoten und 81 linken mittleren Darmbeinlymphknoten ($r_s = 0,817$), zwischen dem Hämosiderosegrad von 81 linken oberflächlichen Leistenlymphknoten und 81 linken Achsellymphknoten ($r_s = 0,747$), zwischen dem Hämosiderosegrad von 87 rechten oberflächlichen Leistenlymphknoten und 87 rechten mittleren Darmbeinlymphknoten ($r_s = 0,756$) sowie zwischen dem Hämosiderosegrad von 84 rechten oberflächlichen Leistenlymphknoten und 84 rechten Achsellymphknoten ($r_s = 0,737$; s. Tabelle 30).

Tabelle 30: Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten der Kontrollen mit dem Hämosiderosegrad der mittleren Darmbeinlymphknoten und dem Hämosiderosegrad der Achsellymphknoten im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten

Untersuchte Lymphknoten	Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %			Korrelation r_s	p-Wert
	Minimum	Maximum	Arithmetischer Mittelwert		
Oberflächliche Leistenlymphknoten, linke Körperseite (n = 81)	0	90	9	0,817	< 0,0001
Mittlere Darmbeinlymphknoten, linke Körperseite (n = 81)	0	80	17		
Oberflächliche Leistenlymphknoten, linke Körperseite (n = 81)	0	90	10	0,747	
Achsellymphknoten, linke Körperseite (n = 81)	0	90	13		
Oberflächliche Leistenlymphknoten, rechte Körperseite (n = 87)	0	90	9	0,756	
Mittlere Darmbeinlymphknoten, rechte Körperseite (n = 87)	0	80	18		
Oberflächliche Leistenlymphknoten, rechte Körperseite (n = 84)	0	90	8	0,737	
Achsellymphknoten, rechte Körperseite (n = 84)	0	80	14		

Außerdem wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Hämosiderosegrad der Kehlganglymphknoten im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten geprüft. Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ergab signifikant ($p < 0,0001$) eine positive Korrelation ($r_s = 0,69$) zwischen dem Hämosiderosegrad caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten und dem Hämosiderosegrad der Kehlganglymphknoten der selben Hunde (s. Tabelle 31).

Tabelle 31: Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten der Kontrollen mit dem Hämosiderosegrad der Kehlganglymphknoten der selben Hunde im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten

Untersuchte Lymphknoten	Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %			Korrelation r_s	p-Wert
	Minimum	Maximum	Arithmetischer Mittelwert		
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 100)	0	90	8	0,69	< 0,0001
Kehlganglymphknoten (n = 100)	0	70	4		

4.3.16. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten mit der Speicherung BBn-Pigments in den selben Lymphknoten

Bei den Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades von 397 Lymphknoten mit dem Auftreten von Berliner Blau-negativem braunem Pigment in Makrophagen (BBn-Pigment: Aposiderin oder Lipofuszin, s. Kapitel 4.2.2.1. und 5.1.3.) in den selben Gewebeschnitten im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabelle 32 sowie Abbildung 39). Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt.

Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte kein signifikanter ($p = 0,172, 0,822, 0,182, 0,758$) Unterschied im Hämosiderosegrad caniner Lymphknoten mit BBn-Pigment (Aposiderin oder Lipofuszin) und caniner Lymphknoten ohne BBn-Pigment nachgewiesen werden.

Tabelle 32: Assoziation des Hämosiderosegrades von Lymphknoten der Kontrollen mit dem Auftreten von BBn-Pigment in den selben Lymphknoten im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Lymphknoten	Anzahl der Lymphknoten, die BBn-Pigment bzw. kein BBn-Pigment enthielten sowie arithmetischer Mittelwert des Hämosiderosegrades dieser Lymphknoten				p-Wert der Assoziation des Hämosiderosegrades der Lymphknoten mit dem Auftreten von BBn-Pigment
	BBn-Pigment		Kein BBn-Pigment		
	n	a. M.	n	a. M.	
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 100)	30	9,5	70	7,4	0,172
Mittlere Darmbein-lymphknoten (n = 98)	9	14,5	89	16,4	0,822
Achsellymphknoten (n = 99)	14	13,8	85	13,5	0,182
Kehlgangslymphknoten (n = 100)	62	1,9	38	6,2	0,758
Summe	115		282		

n: Anzahl der Lymphknoten; a. M.: arithmetischer Mittelwert.

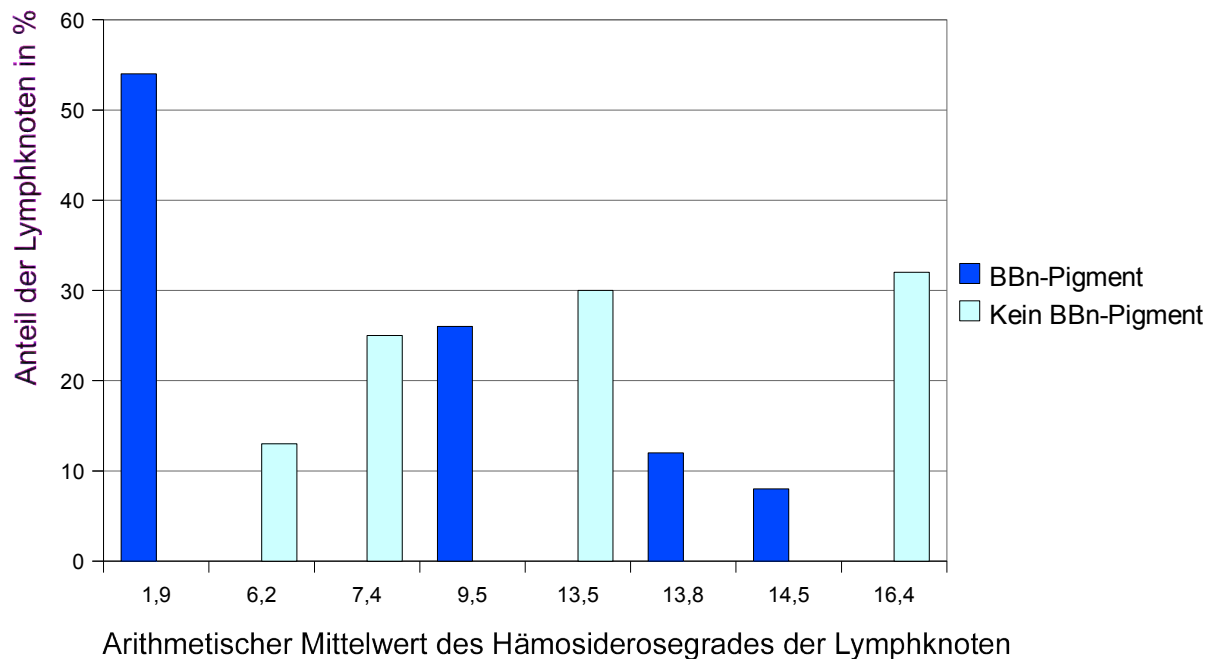


Abbildung 39: Arithmetischer Mittelwert des Hämosiderosegrades von Lymphknoten der Kontrollen mit und ohne BBn-Pigment.

4.3.17. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten und Milzen mit dem Auftreten von Neoplasien, neutrophilen Granulozyten und weiteren Veränderungen in den selben Geweben

4.3.17.1. Neoplasien

Bei Hunden der Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades von 397 Lymphknoten und 99 Milzen mit dem Auftreten von anderen Neoplasien als Mammatumoren in den selben Geweben im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabelle 33 sowie Abbildung 40). Metastasen von Mammatumoren traten nicht auf. Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte kein

signifikanter ($p = 0,731, 0,509, 1,0, 0,384, 0,071$) Unterschied im Hämosiderosegrad der Lymphknoten und Milzen mit Neoplasie und Lymphknoten und Milzen ohne Neoplasie nachgewiesen werden. Mit einem p -Wert von 0,071 war der Hämosiderosegrad in der Milz nur knapp nicht signifikant mit dem Auftreten von Neoplasien in der Milz assoziiert. Allerdings war der Unterschied im arithmetischen Mittelwert des Hämosiderosegrades bei Milzen mit und Milzen ohne Neoplasien nur gering. Zudem ergaben die untersuchten Lymphknoten keine Hinweise auf eine statistisch signifikante Assoziation zwischen Hämosiderosegrad und Neoplasie.

Tabelle 33: Assoziation des Hämosiderosegrades von Lymphknoten und Milzen der Kontrollen mit dem Auftreten von Neoplasien in den selben Geweben im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Lymphknoten/Milz	Anzahl der Lymphknoten/Milzen, die Neoplasien bzw. keine Neoplasien aufwiesen sowie arithmetischer Mittelwert des Hämosiderosegrades dieser Lymphknoten				p-Wert der Assoziation des Hämosiderosegrades der Lymphknoten/Milzen mit dem Auftreten von Neoplasien
	Neoplasien		Keine Neoplasien		
	n	a. M.	n	a. M.	
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 100)	5	12,0	95	7,8	0,731
Mittlere Darmbein-lymphknoten (n = 98)	7	24,6	91	15,6	0,509
Achsellymphknoten (n = 99)	7	7,5	92	14,0	1,000
Kehlganglymphknoten (n= 100)	6	1,7	94	3,7	0,384
Milz (n = 99)	9	12,5	90	9,8	0,071
Summe	34		462		

n: Anzahl der Lymphknoten; a. M.: arithmetischer Mittelwert.

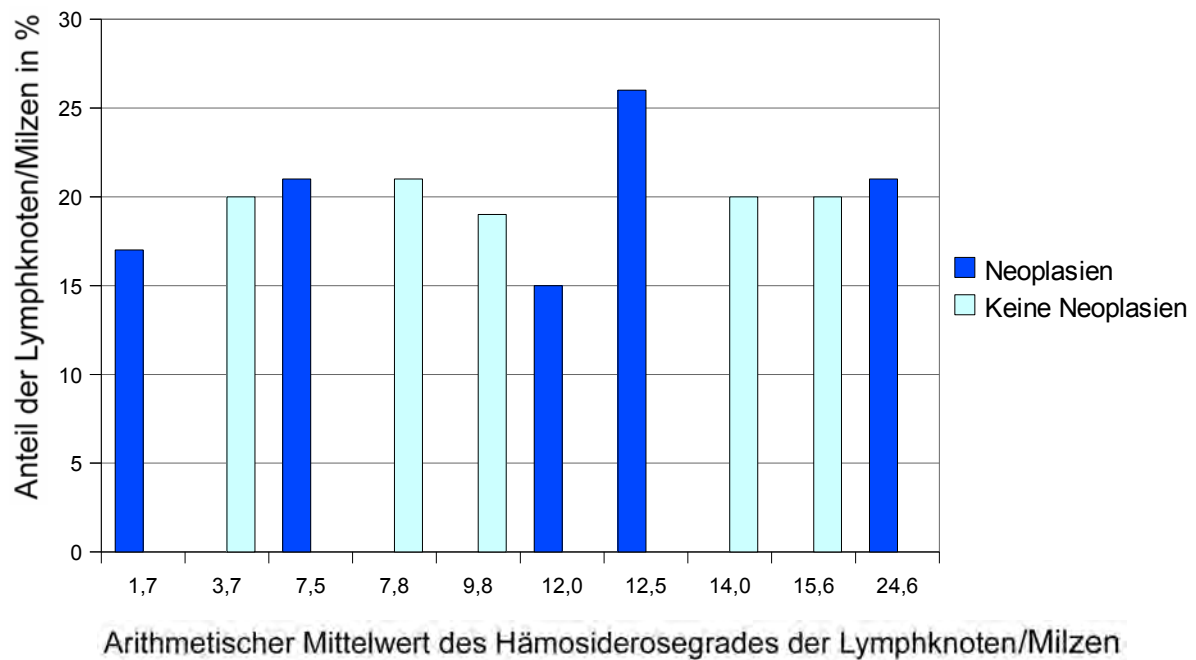


Abbildung 40: Arithmetischer Mittelwert des Hämosiderosegrades der Lymphknoten und Milzen der Kontrollen mit und ohne Neoplasien.

4.3.17.2. Neutrophile Granulozyten

Bei den Kontrollen wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades von 100 oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten in den selben Lymphknoten im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabelle 34). Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Die mittleren Darmbeinlymphknoten und die Achsellymphknoten wurden aufgrund der geringen Datenmenge nicht ausgewertet. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte kein signifikanter ($p = 0,263$) Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit und der oberflächlichen Leistenlymphknoten ohne neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden.

Tabelle 34: Assoziation des Hämosiderosegrades von Lymphknoten der Kontrollen mit dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten in den selben Lymphknoten im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Lymphknoten	Anzahl der Lymphknoten, die np. Granulozyten bzw. keine np. Granulozyten enthielten sowie arithmetischer Mittelwert des Hämosiderosegrades dieser Lymphknoten				p-Wert der Assoziation des Hämosiderosegrades der Lymphknoten mit dem Auftreten von np. Gran.
	Np. Gran.		Keine np. Gran.		
	n	a. M.	n	a. M.	
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 100)	4	0,05	96	8,38	0,263

n: Anzahl der Lymphknoten; Np. Gran.: neutrophile Granulozyten; a. M.: arithmetischer Mittelwert.

4.3.17.3. Weitere Veränderungen

Bei den Kontrollen wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades von 397 Lymphknoten und 99 Milzen mit dem Auftreten von weiteren Veränderungen (follikuläre Hyperplasie, Sinushistiozytose, Hyperämie, Erythrozyten im Sinus, Hyperämie mit Erythrozyten im Sinus und Gewebe, Sinusödem und/oder extramedulläre Hämatopoese) in den selben Geweben im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabelle 35 sowie Abbildung 41). Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte kein signifikanter ($p = 0,665, 0,619, 0,541, 0,231, 0,403$) Unterschied im Hämosiderosegrad der Lymphknoten und Milzen mit weiteren Veränderungen und Lymphknoten und Milzen ohne weitere Veränderungen nachgewiesen werden.

Tabelle 35: Assoziation des Hämosiderosegrades von Lymphknoten und Milzen der Kontrollen mit dem Auftreten von weiteren Veränderungen (weit. V.) im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Lymphknoten/Milz	Anzahl der Lymphknoten/Milzen, die weit. V. bzw. keine weit. V. aufwiesen sowie arithmetischer Mittelwert des Hämosiderosegrades dieser Lymphknoten/Milzen				p-Wert der Assoziation des Hämosiderosegrades der Lymphknoten/Milzen mit dem Auftreten von weit. V.
	Weit. V.		Keine weit. V.		
	n	a. M.	n	a. M.	
Oberflächliche Leisten-lymphknoten (n = 100)	16	5,7	84	8,5	0,665
Mittlere Darmbein-lymphknoten (n = 98)	24	15,2	74	16,6	0,619
Achsellymphknoten (n = 99)	23	13,2	76	13,6	0,541
Kehlgangslymphknoten (n = 100)	44	7,3	56	11,4	0,231
Milz (n = 99)	32	3,4	67	3,7	0,403
Summe	139		357		

n: Anzahl der Lymphknoten; Weit. V.: weitere Veränderungen; a. M.: arithmetischer Mittelwert.

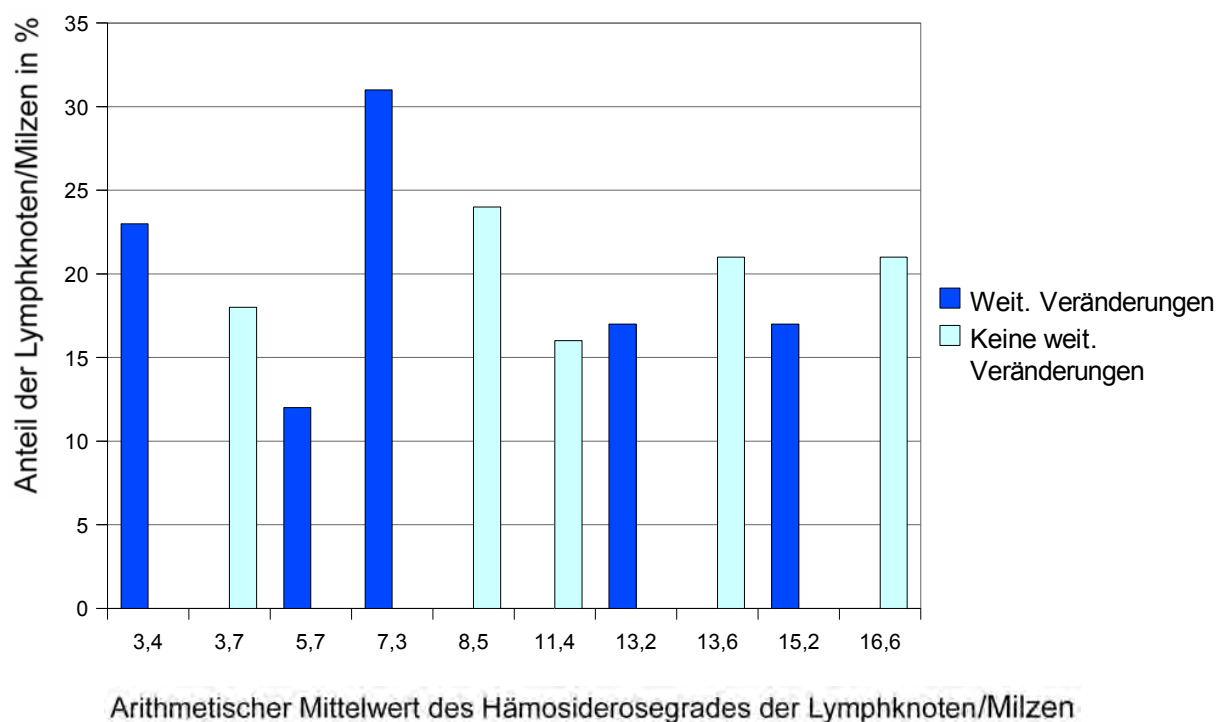


Abbildung 41: Arithmetischer Mittelwert des Hämosiderosegrades der Lymphknoten und Milzen der Kontrollen mit und ohne weitere Veränderungen.

4.3.18. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten und Milzen mit dem Auftreten von Laktoferrin in den selben Geweben

Bei Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades von 32 Lymphknoten und 4 Milzen mit dem Auftreten von Laktoferrin in den selben Geweben im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabelle 36 sowie Abbildung 42). Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte keine statistisch signifikante ($p = 0,837, 0,665, 0,434, 0,817, 0,637$) Assoziation des Hämosiderosegrades der Lymphknoten und Milzen mit dem Auftreten von Laktoferrin in den selben Geweben nachgewiesen werden.

Tabelle 36: Assoziation des Hämosiderosegrades von Lymphknoten und Milzen der Kontrollen mit dem Auftreten von Laktoferrin (Lf.) in den selben Geweben im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Lymphknoten/Milz	Anzahl der Lymphknoten/Milzen, die Lf. bzw. kein Lf. enthielten sowie arithmetischer Mittelwert des Hämosiderosegrades dieser Lymphknoten/Milzen				p-Wert der Assoziation des Hämosiderosegrades der Lymphknoten/Milzen mit dem Auftreten von Lf.
	Laktoferrin		Kein Laktoferrin		
	n	a. M.	n	a. M.	
Oberflächliche Leisten-lymphknoten (n = 9)	1	0,10	8	2,7	0,837
Mittlere Darmbein-lymphknoten (n = 10)	2	0,05	8	1,3	0,665
Achsellymphknoten (n = 9)	2	0,05	7	0,3	0,434
Kehlgangslymphknoten (n = 4)	1	3,70	3	0,1	0,817
Milz (n = 4)	3	0,10	1	13,3	0,637
Summe	9		27		

n: Anzahl der Lymphknoten; a. M.: arithmetischer Mittelwert.

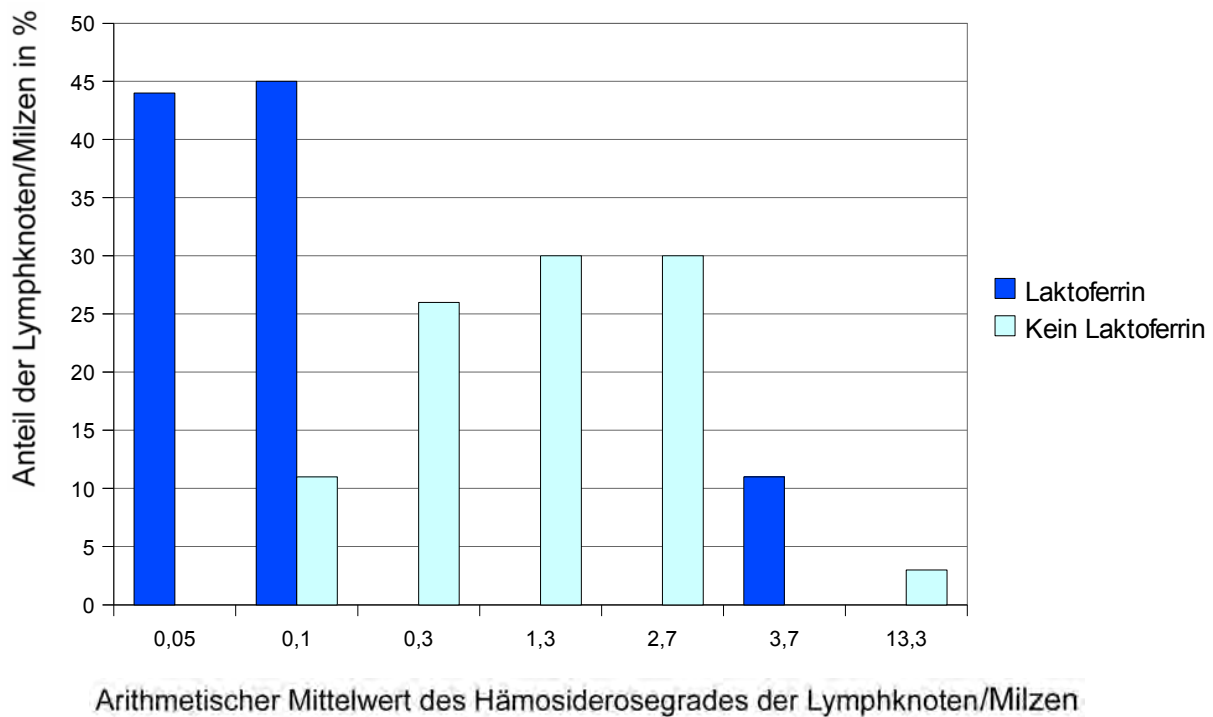


Abbildung 42: Arithmetischer Mittelwert des Hämosiderosegrades der Lymphknoten und Milzen der Kontrollen mit und ohne Laktoferrin.

4.3.19. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Hämosiderosegrad der Milz

Bei 99 Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Hämosiderosegrad der Milz des selben Hundes im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten geprüft (s. Tabelle 37). Wenn beide oberflächlichen Leistenlymphknoten vorlagen, wurde einer per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ergab signifikant ($p < 0,0001$) eine positive Korrelation ($r_s = 0,643$) zwischen dem Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten und dem Hämosiderosegrad der Milz des selben Hundes.

Tabelle 37: Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten der Kontrollen mit dem Hämosiderosegrad der Milz des selben Hundes im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten

Untersuchte Gewebe	Hämosiderosegrad der Gewebe in %			Korrelation r_s	p-Wert
	Minimum	Maximum	Arithmetischer Mittelwert		
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 99)	0	90	8	0,643	< 0,0001
Milz (n = 99)	0	70	10		

4.3.20. Assoziation der Eisenspeicherung in caninen Mammatumoren mit der Eisenspeicherung im zugehörigen unveränderten Milchdrüsengewebe

Bei 86 Fällen (Hunde mit Mammatumoren) wurde eine Assoziation des maximalen Eisengehalts des unveränderten Milchdrüsengewebes in verschiedenen Lokalisationen (hämosiderinhaltige Makrophagen im Stroma, hämosiderin- oder ferritinhaltige Drüsenepithelien, hämosiderinhaltige Makrophagen im Drüsenlumen, hämosiderin- oder ferritinhaltiges Sekret im Drüsenlumen, s. Kapitel 3.2.5.1.3.) mit dem maximalen Eisengehalt der Mammatumoren in verschiedenen Lokalisationen (s. unverändertes Milchdrüsengewebe) geprüft. Pro Hund konnten mehrere Mammatumoren auftreten. Es wurde zur Auswertung nur der Tumor genommen, der am meisten Berliner Blau-positives Pigment zeigt. Bei den Mammatumoren und dem unveränderten Milchdrüsengewebe lag der arithmetische Mittelwert des maximalen Hämosideringehalts zwischen den Bewertungsstufen „vereinzelt(e) eisenhaltige(s) Zellen/Sekret“ (Stufe 1) und „wenig(e) eisenhaltige(s) Zellen/Sekret“ (Stufe 2). Dabei lag der arithmetische Mittelwert des Milchdrüsengewebes mit 1,67 höher als der arithmetische Mittelwert der Mammatumoren mit 1,2. Dieser Unterschied war im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ($p = 0,011$) und im t-Test ($p = 0,008$) signifikant.

Im Spearman-Rangkorrelationskoeffizient konnte keine signifikante ($p = 0,078$) Korrelation ($r_s = 0,191$) zwischen dem maximalen Eisengehalt des unveränderten Milchdrüsengewebes und dem maximalen Eisengehalt der Mammatumoren nachgewiesen werden. Mit einem p-Wert von 0,078 war dies jedoch nur knapp nicht signifikant. Es könnte sich bei der Untersuchung einer größeren Datenmenge eine signifikante Korrelation zeigen, die allerdings nicht eng wäre ($r_s = 0,191$).

4.3.21. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit der Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder im Mammatumor des selben Hundes

Bei 100 Hunden der Fälle (Hunde mit Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit der Eisenspeicherung (Hämosiderin oder Ferritin, s. Kapitel 5.1.1.) im unveränderten Milchdrüsengewebe und im Mammatumor im exakten Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabellen 38 und 39 sowie Abbildungen 43 und 44). Pro Hund lag immer nur ein oberflächlicher Leistenlymphknoten zur Untersuchung vor. Es wurde nicht unterschieden, ob die Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe oder im Mammatumor auftrat. Zur Auswertung wurde immer die Lokalisation gewählt, die die stärkste Eisenspeicherung zeigte. So wurde auch verfahren wenn pro Hund mehrere Mammatumoren auftraten. Hunde mit Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor zeigten einen höheren Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten als Hunde ohne Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor. Dies war im exakten Wilcoxon-Mann-Whitney-Test signifikant ($p = 0,039$).

Tabelle 38: Zweidimensionale Häufigkeitstabelle für den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Fälle in % und die Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor des selben Hundes

Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder im Mammatumor			
	Keine Eisenspeicherung		Eisenspeicherung	
	n	%	n	%
0	4	26,6	8	9,4
0,1	4	26,6	14	16,5
1	1	6,7	14	16,5
10	3	20	14	16,5
20	1	6,7	10	11,8
30	1	6,7	10	11,8
40	1	6,7	4	4,7
50	0	0	4	4,7
60	0	0	4	4,7
70	0	0	3	3,4
80	0	0	0	0
90	0	0	0	0
Summe	15	100	85	100

n: Anzahl der Lymphknoten; %: Anteil der Lymphknoten in %.

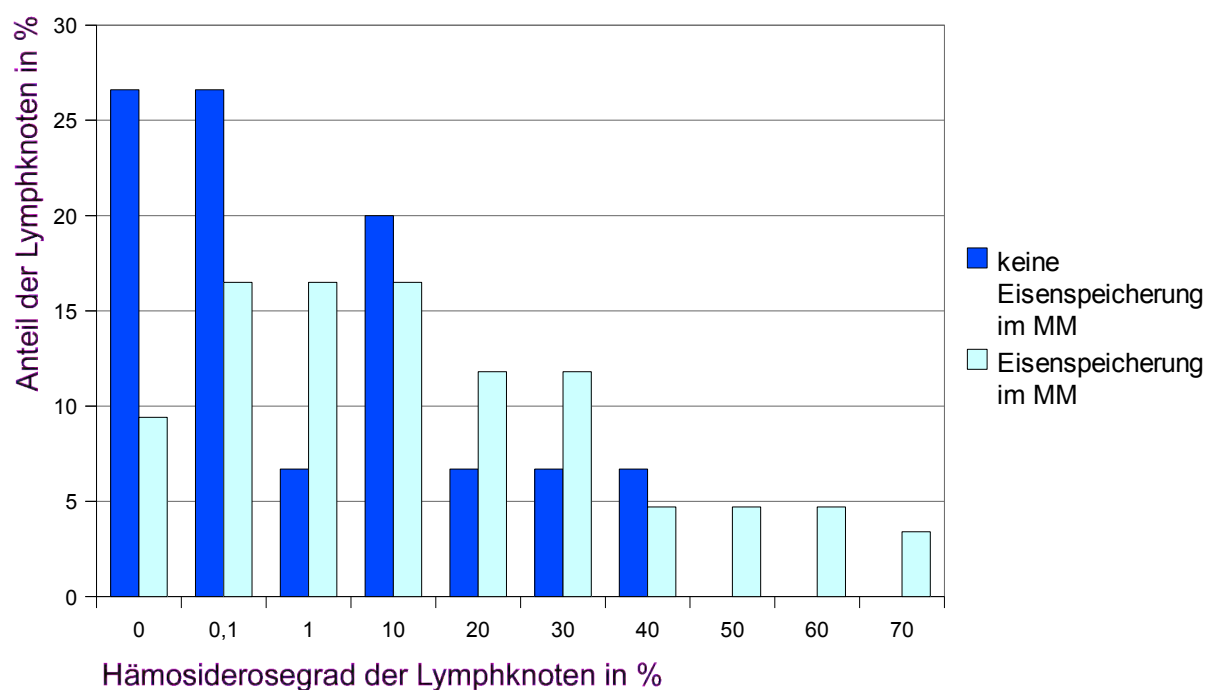


Abbildung 43: Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten der Fälle in % und der Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor (MM) des selben Hundes.

Tabelle 39: Hämosiderosegrad caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten der Fälle in % und Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor des selben Hundes

Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten in %	Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor	
	Keine Eisenspeicherung (n = 85)	Eisenspeicherung (n = 15)
Minimum	0	0
1.Quartil	0	0,1
Median	0,1	10
3. Quartil	10	30
Maximum	40	70

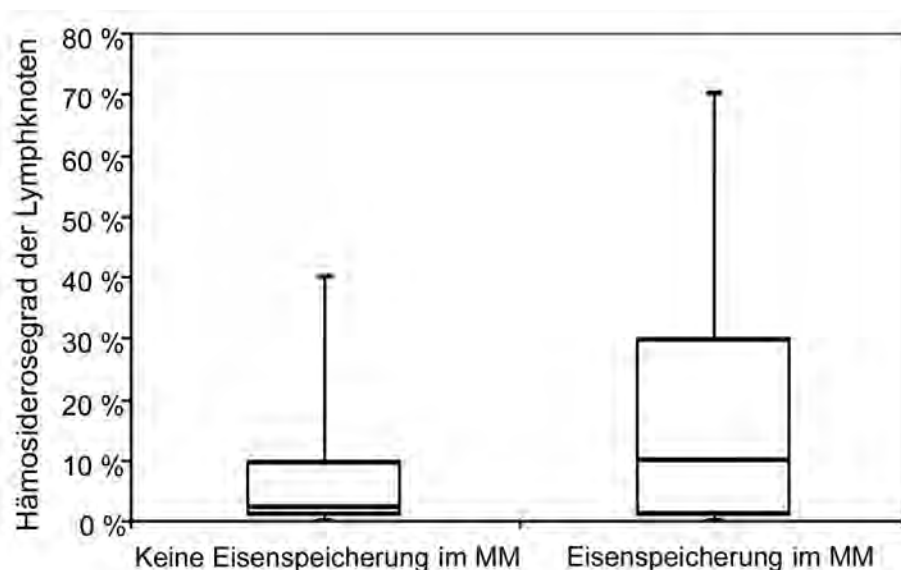


Abbildung 44: Hämosiderosegrad caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten der Fälle in % und Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor (MM) im Box-and-Whisker-Plot.

4.3.22. Assoziation des Hämosiderosegrades caniner Lymphknoten und Milzen mit dem Auftreten von hämosiderinhaltigem Bindegewebe in den selben Gewebeschnitten

Bei den Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Hämosiderosegrades von 397 Lymphknoten und 99 Milzen mit dem Auftreten von hämosiderinhaltigem Bindegewebe in den Lymphknoten- und Milztrabekeln (s. Kapitel 3.2.5.1. sowie Abbildung 11, Kapitel 4.2.1.1.) der selben Gewebeschnitte im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test geprüft (s. Tabelle 40 sowie Abbildung 45). Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Bei allen Lymphknoten und den Milzen lag der Median des Hämosiderosegrades bei den Geweben mit hämosiderinhaltigem Bindegewebe höher als bei den Geweben ohne hämosiderinhaltiges Bindegewebe. Dies war im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test signifikant ($p = 0,001$, $< 0,0001$, $< 0,0001$, $0,025$), außer bei den Achsellymphknoten ($p = 0,127$).

Tabelle 40: Assoziation des Hämosiderosegrades von Lymphknoten und Milzen der Kontrollen mit dem Auftreten von hämosiderinhaltigem Bindegewebe in den selben Gewebeschnitten im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Lymphknoten/Milz	Anzahl der Lymphknoten/Milzen, die häm. Bdgw. bzw. kein häm. Bdgw. aufwiesen sowie Median des Hämosiderosegrades dieser Lymphknoten/Milzen				p-Wert der Assoziation des Hämosiderosegrades der Lymphknoten/Milzen mit dem Auftreten von häm. Bdgw.
	Häm. Bdgw.		Kein häm. Bdgw.		
	Anzahl	Median	Anzahl	Median	
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 100)	5	50-60	95	0,1	0,001
Mittlere Darmbein-lymphknoten (n = 98)	12	40	86	0,1	< 0,0001
Achsellymphknoten (n = 99)	5	40-50	94	0,1	0,127
Kehlgangsymphknoten (n = 100)	4	40	96	0,1	< 0,0001
Milz (n = 99)	4	25	95	1,0	0,025
Summe	30		371		

Häm. Bdgw.: hämosiderinhaltiges(m) Bindegewebe der Trabekel.

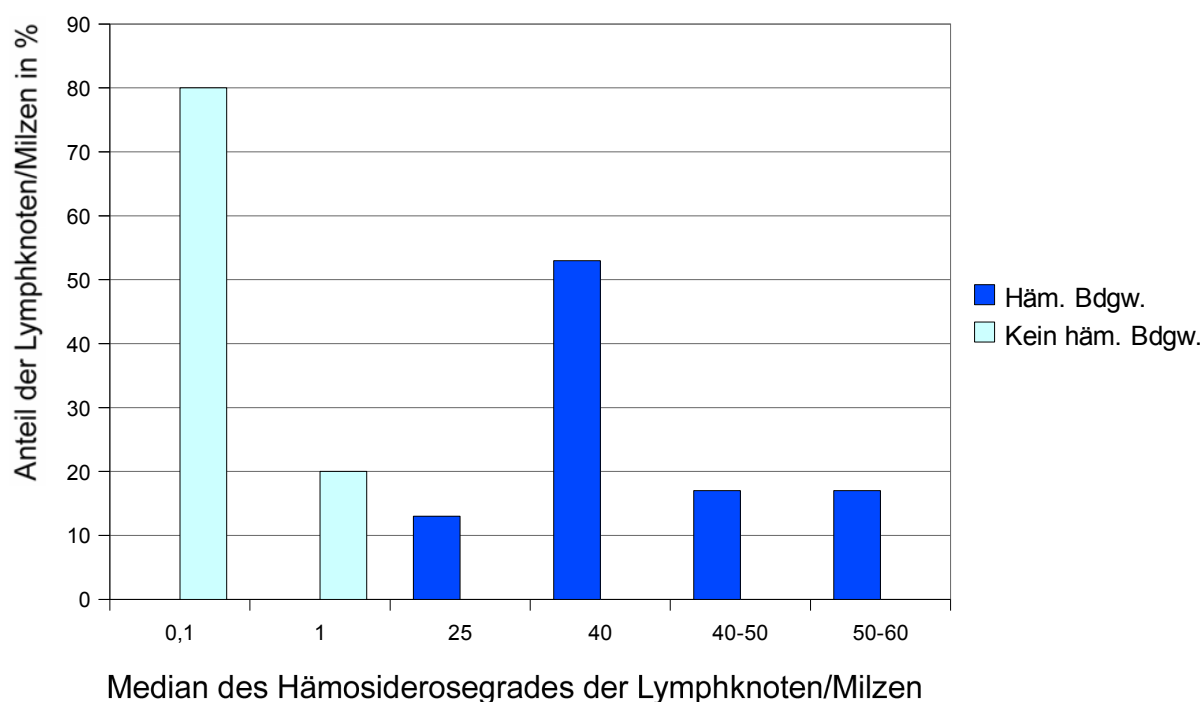


Abbildung 45: Median des Hämosiderosegrades der Lymphknoten und Milzen der Kontrollen die hämosiderinhaltiges Bindegewebe bzw. keines aufwiesen.

4.3.23. Assoziation der Eisenspeicherung in caninen Mammatumoren mit der Tumorart

Bei 13 einfachen Adenomen, 41 komplexen Adenomen, 26 tubulopapillären Karzinomen, 35 komplexen Karzinomen, 22 benignen und 8 malignen Mischtumoren, 7 soliden Karzinomen, einem anaplastischen Karzinom und 2 Fibroadenomen wurde eine Assoziation der Eisenspeicherung im Tumor (Hämosiderin oder Ferritin, s. Kapitel 5.1.1.) mit der Tumorart geprüft. Es wurde die Eisenspeicherung in Makrophagen im Tumorstroma (Hämosiderin), in Drüsenepithelien der Tumoren (Hämosiderin oder Ferritin), in Makrophagen im Drüsenlumen der Tumoren (Hämosiderin) und im Sekret im Drüsenlumen der Tumoren semiquantitativ (s. Kapitel 3.2.5.1.3.) erfasst. Pro Hund konnte die gleiche Mammatumorart mehrmals auftreten. Es wurde zur Auswertung nur die Tumorart gewählt, die am meisten Berliner Blau-positives Pigment zeigte. Sehr viele hämosiderinhaltige

Makrophagen im Tumorstroma traten beim anaplastischen Karzinom auf. Wenige bis einige hämosiderinhaltige Makrophagen im Tumorstroma traten bei den komplexen Karzinomen sowie bei den benignen und malignen Mischtumoren auf. Die anderen Tumorarten zeigten keine oder nur vereinzelte hämosiderinhaltige Makrophagen im Tumorstroma (s. Kapitel 4.2.1.2.). Dies war im Kruskal-Wallis-Test knapp nicht signifikant ($p = 0,085$). Es könnte sich bei der Untersuchung einer größeren Datenmenge eine signifikante Assoziation der Eisenspeicherung in stromalen Makrophagen mit der Tumorart zeigen. Die Eisenspeicherung in Drüsenepithelien ($p = 0,884$), in Makrophagen im Drüsenlumen ($p = 0,778$) und im Sekret im Drüsenlumen der Tumoren ($p = 0,212$) zeigte keine signifikante Assoziation mit der Mammatumortart.

4.3.24. Assoziation der Eisenspeicherung in caninen Mammatumoren mit dem Auftreten von Laktoferrin in den selben Tumoren in der selben Lokalisation

Bei 59 Fällen (Hunde mit Mammatumoren) wurde eine Assoziation der Eisenspeicherung in Mammatumoren in verschiedenen Lokalisationen (hämosiderinhaltige Makrophagen im Stroma, hämosiderin- oder ferritinhaltige Drüsenepithelien, hämosiderinhaltige Makrophagen im Drüsenlumen, hämosiderin- oder ferritinhaltiges Sekret im Drüsenlumen; s. Kapitel 3.2.5.1.3.) mit dem Auftreten von Laktoferrin in der selben Lokalisation (s. Kapitel 3.2.5.9.2.) in einer Regressionsanalyse geprüft. Dabei konnte keine signifikante ($p = 0,388$) Assoziation der Eisenspeicherung in caninen Mammatumoren mit dem Auftreten von Laktoferrin in der selben Lokalisation nachgewiesen werden.

4.3.25. Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in caninen Lymphknoten mit dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten in den selben Lymphknoten

Bei den Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Auftretens von Laktoferrin-positiven Makrophagen in 32 Lymphknoten mit dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten in den selben Lymphknoten im zweiseitigen exakten Fisher-Test geprüft (s. Tabelle 41 sowie Abbildung 46). Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Im zweiseitigen exakten Fisher-Test konnte kein signifikanter (alle $p = 1,0$) Unterschied im Auftreten von Laktoferrin in Lymphknoten mit und in Lymphknoten ohne neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden.

Tabelle 41: Assoziation des Auftretens von Laktoferrin-positiven Makrophagen in Lymphknoten der Kontrollen mit dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten in den selben Lymphknoten im zweiseitigen exakten Fisher-Test

Lymphknoten	Lymphknoten, die np. Gran. bzw. keine np. Gran. enthielten	Anzahl der Lymphknoten, die Laktoferrin bzw. kein Laktoferrin enthielten		p-Wert der Assoziation des Auftretens von Laktoferrin mit dem Auftreten von np. Gran.
		Laktoferrin	Kein Laktoferrin	
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 7)	Np. Gran.	0	3	1,0
	Keine np. Gran.	1	5	
Mittlere Darmbein- lymphknoten (n = 10)	Np. Gran.	0	1	1,0
	Keine np. Gran.	2	7	
Achsellymphknoten (n = 8)	Np. Gran.	0	1	1,0
	Keine np. Gran.	2	6	
Kehlganglymphknoten (n = 4)	Np. Gran.	0	1	1,0
	Keine np. Gran.	1	2	
Summe	Np. Gran.	0	6	
	Keine np. Gran.	6	20	

Np. Gran.: neutrophile Granulozyten.

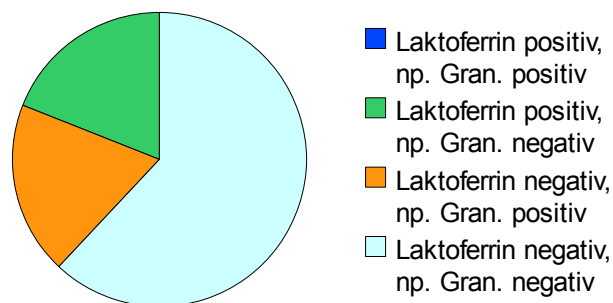


Abbildung 46: Anteil der Lymphknoten in %, die Laktoferrin und/oder neutrophile Granulozyten bzw. weder Laktoferrin noch neutrophile Granulozyten aufwiesen.

4.3.26. Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in caninen oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Auftreten von Laktoferrin im Milchdrüsengewebe und/oder im Mammatumor des selben Hundes

Bei 55 Fällen (Hunde mit Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Auftreten von Laktoferrin im Milchdrüsengewebe und/oder dem Mammatumor im zweiseitigen exakten Fisher-Test geprüft (s. Tabelle 42 sowie Abbildung 47). Es lag pro Hund immer nur ein oberflächlicher Leistenlymphknoten zur Untersuchung vor. Zur Auswertung wurde immer die Laktoferrin-positive Lokalisation gewählt, unabhängig davon, ob Laktoferrin im unveränderten Milchdrüsengewebe oder im Mammatumor auftrat. So wurde auch verfahren wenn pro Hund mehrere Mammatumoren auftraten. Der zweiseitige exakte Fisher-Test zeigte keinen signifikanten ($p = 0,376$) Unterschied im Auftreten von Laktoferrin in oberflächlichen Leistenlymphknoten zwischen Hunden mit und Hunden ohne Laktoferrin im Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor.

Tabelle 42: Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in caninen oberflächlichen Leistenlymphknoten der Fälle mit dem Auftreten von Laktoferrin im Milchdrüsengewebe und/oder dem Mammatumor des selben Hundes im zweiseitigen exakten Fisher-Test

Laktoferrin im Lymphknoten	Laktoferrin im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor		p-Wert
	Vorhanden	Nicht vorhanden	
Vorhanden (n = 7)	4	3	0,376
Nicht vorhanden (n = 48)	36	12	
Summe	40	15	

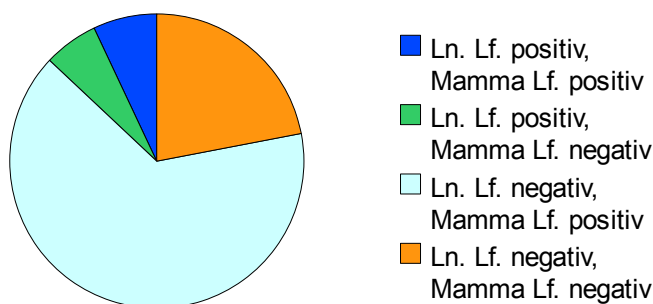


Abbildung 47: Anteil der Hunde in %, die Laktoferrin (Lf.) im Lymphknoten (Ln.) und/oder Laktoferrin in der Milchdrüse aufwiesen.

4.3.27. Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in caninen Mammatumoren mit der Mammatumorart

Bei 10 einfachen Adenomen, 10 komplexen Adenomen, 10 tubulopapillären Karzinomen, 10 komplexen Karzinomen, 10 benignen Mischtumoren, 5 malignen Mischtumoren, 3 soliden Karzinomen und einem anaplastischen Karzinom wurde eine Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in verschiedenen Lokalisationen (Laktoferrin-positive Makrophagen im Tumorstroma, Laktoferrin-positive Drüsenepithelien der Tumoren, Laktoferrin-positive Makrophagen im Drüsenlumen

der Tumoren, Laktoferrin-positives Sekret im Drüsenlumen der Tumoren; s. Kapitel 3.2.5.9.2.) mit der Tumorart geprüft. Laktoferrin-positive Makrophagen im Tumorstroma traten nicht auf (s. Kapitel 4.2.1.2.). Im Kruskal-Wallis-Test konnte keine signifikante Assoziation der Anzahl Laktoferrin-positiver Drüsenepithelien der Tumoren ($p = 0,57$), der Anzahl Laktoferrin-positiver Makrophagen im Drüsenlumen der Tumoren ($p = 0,291$) sowie des Auftretens von Laktoferrin-positivem Sekret im Drüsenlumen der Tumoren ($p = 0,227$) mit der Mammatumorart gezeigt werden.

4.3.28. Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in caninen Lymphknoten mit dem Alter der Hunde

Bei Hunden der Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Auftretens von Laktoferrin in 29 Lymphknoten mit dem Alter der Hunde im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten geprüft. Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Das Alter der Hunde lag zwischen 0,13 und 11 Jahren. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ergab keine signifikante ($p = 0,552, 0,266, 0,266, 0,333$) Korrelation ($r_s = 0,249, 0,416, 0,416, 0,866$) zwischen dem Auftreten von Laktoferrin in caninen Lymphknoten und dem Alter der Hunde (s. Tabelle 43).

Tabelle 43: Korrelation des Auftretens von Laktoferrin in caninen Lymphknoten und dem Alter der Hunde im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten

Lymphknoten/Milz	Spearman-Rangkorrelationskoeffizient (r_s)	p-Wert
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 8)	0,249	0,552
Mittlere Darmbeinlymphknoten (n = 9)	0,416	0,266
Achsellymphknoten (n = 9)	0,416	0,266
Kehlgangslymphknoten (n = 3)	0,866	0,333

4.3.29. Assoziation der Speicherung BBn-Pigments in caninen Lymphknoten mit dem Alter der Hunde

Bei Hunden der Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren) wurde eine Assoziation des Auftretens von BBn-Pigment (Aposiderin oder Lipofuszin, s. Kapitel 4.2.2.2. und 5.1.3.) in 373 Lymphknoten mit dem Alter der Hunde im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten geprüft (s. Tabelle 44). Wenn die Lymphknoten beider Körperseiten vorlagen, wurde ein Lymphknoten per Zufallsgenerator des Statistikprogramms ausgewählt. Das Alter der Hunde lag zwischen 0,08 und 15 Jahren. Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ergab bei den meisten Lymphknoten keine signifikante ($p = 0,636, 0,985, 0,501$) Korrelation ($r_s = 0,050, 0,002, 0,070$) zwischen dem Auftreten von BBn-Pigment in den Lymphknoten und dem Alter der Hunde. Allerdings konnte bei den oberflächlichen Leistenlymphknoten eine signifikante ($p = 0,012$) positive Korrelation ($r_s = 0,259$) zwischen dem Auftreten von BBn-Pigment und dem Alter der Hunde gezeigt werden, die aber nicht eng war.

Tabelle 44: Korrelation der Speicherung BBn-Pigments (Aposiderin oder Lipofuszin) in caninen Lymphknoten und dem Alter der Hunde im Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten

Lymphknoten	Spearman-Rangkorrelationskoeffizient (r_s)	p-Wert
Oberflächliche Leistenlymphknoten (n = 94)	0,259	0,012
Mittlere Darmbeinlymphknoten (n = 92)	0,050	0,636
Achsellymphknoten (n = 93)	0,002	0,985
Kehlgangslymphknoten (n = 94)	0,070	0,501

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

4.4.1. Statistische signifikante Assoziationen ($p \leq 0,05$)

- Assoziation des Hämosiderosegrades oberflächlicher Leistenlymphknoten mit:
 - der Geschlechtsreife des Hundes ($p < 0,0001$; s. Kapitel 4.3.5.)
 - dem Hämosiderosegrad der Achsel-, mittleren Darmbein- und Kehlganglymphknoten ($p < 0,0001$; s. Kapitel 4.3.15.) sowie der Milz ($p < 0,0001$; s. Kapitel 4.3.19.)
 - der Eisenspeicherung im unveränderten Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor ($p = 0,039$; s. Kapitel 4.3.21.)
- Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten, der mittleren Darmbeinlymphknoten und der Achsellymphknoten mit der Lokalisation dieser Lymphknoten im Körper ($p = 0,001$; s. Kapitel 4.3.14.)
- Assoziation des Hämosiderosegrades aller Lymphknoten und Milzen mit:
 - dem Alter der Hunde ($p < 0,0001$; s. Kapitel 4.3.6.)
 - dem Auftreten von hämosiderinhaltigem Bindegewebe in Trabekeln des selben Gewebeschnitts, ausgenommen der Achsellymphknoten ($p = 0,001, < 0,0001, = 0,025$; s. Kapitel 4.3.22.)
- stärkere Eisenspeicherung im caninen Milchdrüsengewebe als im Mammatumor ($p = 0,008$; s. Kapitel 4.3.20.)
- Assoziation des Auftretens von intrazellulärem, Berliner Blau-negativem, braunem Pigment in Makrophagen der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem Alter der Hunde ($p = 0,012$; s. Kapitel 4.3.29.)

4.4.2. Knapp nicht statistisch signifikante Assoziationen (p = 0,051 – 0,099)

- Assoziation des Hämosiderosegrades caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten mit dem Auftreten von Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen im Einzugsgebiet der oberflächlichen Leistenlymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten (p = 0,09; s. Kapitel 4.3.10.)
- Assoziation des Auftretens von hämosiderinhaltigen Makrophagen im Stroma caniner Mammatumoren mit der Tumorart (p = 0,085; s. Kapitel 4.3.23.)
- Assoziation der Eisenspeicherung in caninen Mammatumoren mit der Eisenspeicherung im zugehörigen Milchdrüsengewebe (p = 0,078; s. Kapitel 4.3.20.)
- Assoziation der Eisenspeicherung in der Milz mit dem Auftreten von Neoplasien in der Milz (p = 0,071; s. Kapitel 4.3.17.1.)

5. Diskussion

Ziel dieser Untersuchungen war es, mittels Eisenfärbungen und Immunhistologie eisenhaltiges goldbraunes Pigment in oberflächlichen Leistenlymphknoten von Hunden zu identifizieren. Weiterhin sollten mögliche Ursachen dieser Pigmentspeicherung hergeleitet werden.

5.1. Identität des Pigments

5.1.1. Berliner Blau-positives Pigment

Berliner Blau-positive Reaktionen können durch Hämosiderin (Gömöri, 1936), Ferritin (Pearse, 1985) oder eisenhaltiges Laktoferrin (Siebein, 1991) verursacht sein.

Berliner Blau-positive Reaktionen traten in der eigenen Untersuchung in Makrophagen der Lymphknoten, der Milz, der Mammatumoren sowie der unveränderten Milchdrüse auf. Zudem zeigten auch epitheliale Zellen von Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse Berliner Blau-positive Reaktionen. Extrazelluläre Berliner Blau-positive Reaktionen traten im Sekret in Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse, am Bindegewebe der Milz- und Lymphknotentrabekel sowie selten in der Lymphe in Lymphknoten auf.

Makrophagen der Lymphknoten, der Milz, der Mammatumoren sowie der unveränderten Milchdrüse: In der eigenen Untersuchung stellte sich das Berliner Blau-positive Pigment in Makrophagen als schollig oder körnig dar und war in der H.E.-Färbung goldgelb bis dunkelbraun pigmentiert (s. Abbildungen 9 und 10, Kapitel 4.2.1.1.). Diese histologischen Eigenschaften entsprechen denen von Hämosiderin (Goessner, 1953). Auch andere Autoren konnten Hämosiderin in Makrophagen von Lymphknoten, Milz und Mammatumoren nachweisen (Marin-Padilla, 1977; Meguro et al., 2005).

Epitheliale Zellen von Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse:

In der eigenen Untersuchung zeigten epitheliale Zellen von Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse eine diffuse Berliner Blau-positive Reaktion (s. Abbildung 21, Kapitel 4.2.1.3.). Eine Pigmentierung der epithelialen Zellen war in der H.E.-Färbung nicht zu erkennen. Ferritin kann eine diffuse Berliner Blau-positive Reaktion verursachen (Parmley, 1978; Richter, 1978; Harrison und Arosio, 1996; Andrews, 2005). Über eine Pigmentierung von Ferritin in ungefärbten Schnitten gibt es keine Angaben. Ferritin konnte in epithelialen Zellen von Mammakarzinomen sowie in epithelialen und periacinären Zellen der Milchdrüse nachgewiesen werden (Mason und Taylor, 1978; Rossiello et al., 1984; Shterman et al., 1991). Gegen Ferritin spricht, dass in der eigenen Untersuchung Bindegewebe eine den epithelialen Zellen vergleichbare Färbung in der Berliner Blau-Reaktion (s. Abbildung 11, Kapitel 4.2.1.1.) zeigte, die laut Valli (2007 und 2008) auf Hämosiderin und nicht auf Ferritin zurückzuführen ist. Auch Hämosiderin konnte in epithelialen Zellen von Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Marin-Padilla, 1977). Somit war die Berliner Blau-positive Reaktion der epithelialen Zellen von Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse auf Ferritin oder Hämosiderin zurückzuführen.

Sekret in Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse sowie Lymphe in

Lymphknoten: In der eigenen Untersuchung zeigten das Sekret in Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse sowie die Lymphe in Lymphknoten eine den epithelialen Zellen vergleichbare Färbung in der Berliner Blau-Reaktion (s. Abbildung 48). Zudem erschienen auch sie unpigmentiert in der H.E.-Färbung. Es sprechen die gleichen Gründe für das Vorliegen von Ferritin oder Hämosiderin wie bei den epithelialen Zellen (s. oben). Allerdings konnte Ferritin bereits in der Lymphe und in der Milch nachgewiesen werden (Leak, 1976; Harrison und Arosio, 1996), während es keine Angaben über das Auftreten von Hämosiderin in der Lymphe oder der Milch gibt. Somit ist die Berliner Blau-positive Reaktion von Lymphe in Lymphknoten und Sekret in Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse eher auf Ferritin zurückzuführen.

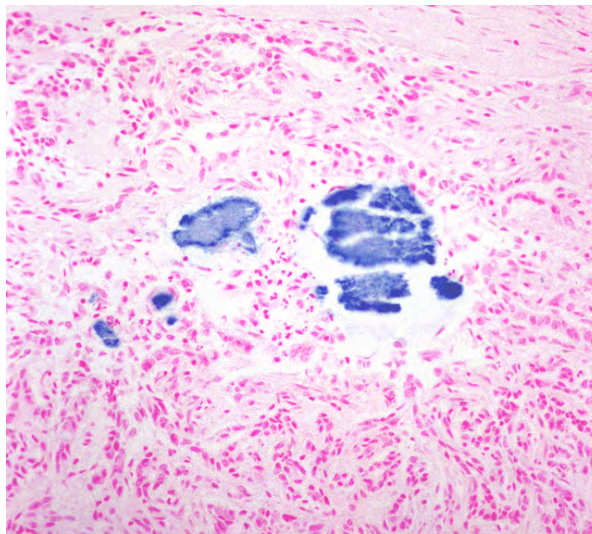


Abbildung 48: Berliner Blau-positives Sekret im Drüsenlumen (Hämosiderin oder Ferritin) eines caninen komplexen Karzinoms (entspricht Abbildung 17, Kapitel 4.2.1.2.). Obj. x 20. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

Laut Siebein (1991) kann auch eisenhaltiges Laktotferrin eine Berliner Blau-positive Reaktion zeigen. Laktotferrin konnte in Makrophagen, u.a. der Lymphknoten, in Acinuszellen normaler und dysplastischer Milchdrüse, in epithelialen Zellen von Fibroadenomen der Milchdrüse und in neoplastischen Zellen von Mammakarzinomen sowie in Lymphe und im Sekret der Milchdrüse nachgewiesen werden (Mason und Taylor, 1978; Rossiello et al., 1984; Taniyama et al., 2000; Kitagawa et al., 2003). Die hier durchgeführte immunhistologische Untersuchung auf Laktotferrin in Lymphknoten, Mammatumoren und unverändertem Milchdrüsengewebe konnte jedoch positive Reaktionen überwiegend nur in Berliner Blau-negativen Bereichen (s. Abbildungen 12 und 13, Kapitel 4.2.1.1., Abbildungen 18 und 20, Kapitel 4.2.1.2. sowie Abbildungen 49 und 50, s. nächste Seiten) zeigen. Es gab nur wenige sich überschneidende Bereiche, bei denen aber lichtmikroskopisch nicht nachgewiesen werden konnte, dass Laktotferrin tatsächlich Berliner Blau-positiv reagierte. Auch statistisch konnte keine Assoziation zwischen den Lokalisationen von Laktotferrin-positiver und Berliner Blau-positiver Reaktion in Lymphknoten, Milzen, Mammatumoren und unverändertem Milchdrüsengewebe nachgewiesen werden (s. Kapitel 4.3.18. und 4.3.24.). In der eigenen Untersuchung

zeigte nur ein caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten Laktoferrin-positive Lymphe. Diese war überwiegend Berliner Blau-negativ, nur im Bereich hämosiderinhaltiger Makrophagen im Sinus zeigte sich eine leichte Berliner Blau-positive Reaktion der Lymphe (s. Abbildungen 13 und 14, Kapitel 4.2.1.1.), die hier wohl eher auf Hämosiderin oder Ferritin zurückzuführen war.

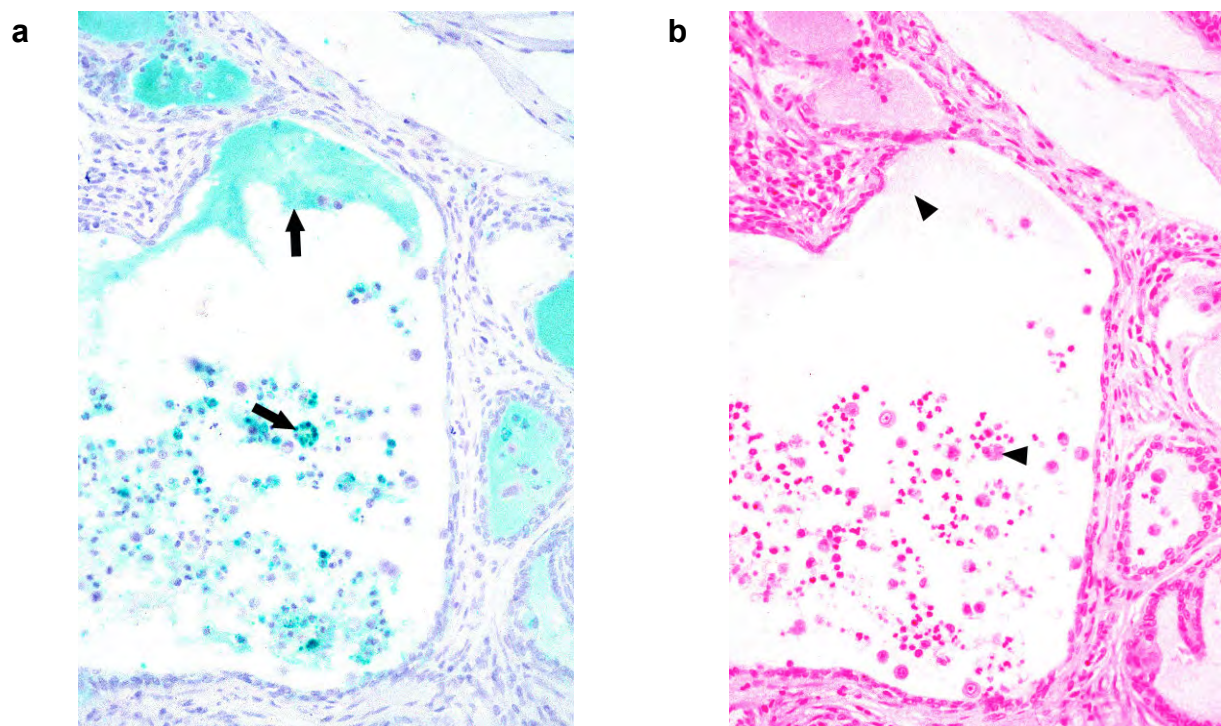


Abbildung 49: Serienschnitte eines komplexen Adenoms in einer caninen Milchdrüse immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt (entspricht Abbildung 19, Kapitel 4.2.1.2.). a Laktoferrin-positives Sekret und Laktoferrin-positive Makrophagen (Pfeile) im Drüsenlumen des komplexen Adenoms. Obj. x 10. Schaf anti-humanes Laktoferrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. b Berliner Blau-negatives Sekret und Berliner Blau-negative Makrophagen (Pfeilspitzen) im Drüsenlumen des komplexen Adenoms. Obj. x 10. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

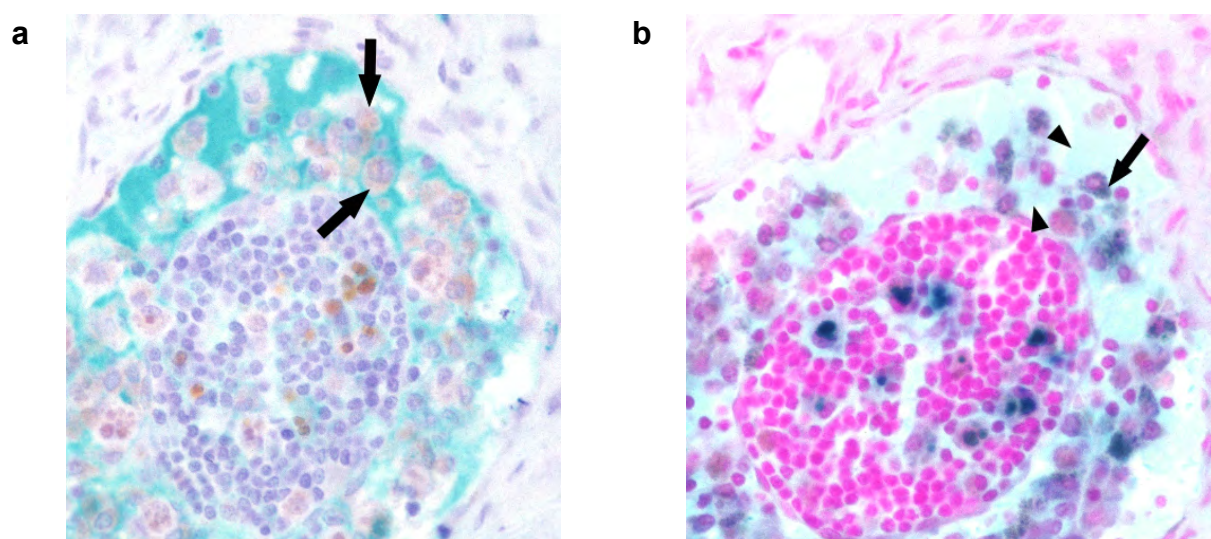


Abbildung 50: Serienschritte eines caninen Lymphknotens immunhistologisch und mit der Berliner Blau-Reaktion gefärbt (entspricht Abbildung 14, Kapitel 4.2.1.1.). **a** Laktoterrin-positiv Lympe und braunes, Laktoterrin-negatives Pigment in Makrophagen (Pfeile) des Randsinus. Obj. x 40. Schaf anti-humanen Laktoterrin, ABC (HistoGreen), Gegenfärbung Papanicolaous Hämatoxylin. **b** Teilweise Berliner Blau-positive Lympe (Pfeilspitzen; Hämosiderin oder Ferritin) und hämosiderinhaltige Makrophagen (Pfeil) im Randsinus. Obj. x 40. Berliner Blau-Reaktion, Gegenfärbung Kernechtrot.

Die Berliner Blau-negative Reaktion von Laktoterrin in der eigenen Untersuchung war vermutlich auf eisenfreies oder nur gering eisenhaltiges Laktoterrin zurückzuführen. Eine Herauslösung des Eisens durch saure Fixantien ist dabei unwahrscheinlich, da zum einen Eisen durch eine Berliner Blau-positive Reaktion in den Geweben nachgewiesen werden konnte, zum anderen wurden die Lymphknoten der Kontrollen in gepuffertem neutralen Formalin fixiert. Laktoterrin schien nicht wesentlich an einer Berliner Blau-positiven Reaktion in Lymphknoten, Mammatumoren und unverändertem Milchdrüsengewebe beteiligt gewesen zu sein.

5.1.2. Turnbells Blau-Reaktion

Gömöri (1936) untersuchte verschiedenste Gewebe auf eine positive Turnbells Blau-Reaktion, konnte lichtmikroskopisch jedoch mit dieser Methode kein zweiwertiges Eisen nachweisen. Lillie und Fullmer (1976) dagegen konnten Turnbells Blau-positive Reaktionen im Bereich Berliner Blau-positiver finden, allerdings nicht in Lymphknoten. Auch Meguro et al. (2005), die mittels hoch sensitiver Perfusions-Turnbells Blau-Methode verschiedene Gewebe untersuchten, konnten zweiwertiges Eisen v.a. im Bereich von Hämosiderinablagerungen nachweisen. Dies war auch in Lymphknoten der Fall. In der eigenen Untersuchung konnten keine positiven Turnbells Blau-Reaktionen in caninen Lymphknoten, Milzen, Mammatumoren oder unverändertem Milchdrüsengewebe gefunden werden (s. Kapitel 4.2.). Die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Autoren und der eigenen Untersuchung ließen sich zum einen durch das seltene Auftreten von mittels Turnbells Blau-Reaktion nachweisbarem zweiwertigem Eisen im Körper erklären (Romeis, 1989; Pearse, 1985). Zum anderen weist die Methode von Meguro et al. (2005) eine höhere Sensitivität (immunhistologische Verstärkung der Färbung, elektronenmikroskopische Untersuchung, in vivo durchgeführte Turnbells Blau-Reaktion) auf. Bei der in vivo durchgeführten Turnbells Blau-Reaktion reduziert sich die Gefahr der Oxidation von zweiwertigem Eisen während der Gewebebehandlung. Es ist unklar, ob zweiwertiges Eisen in den Geweben der eigenen Untersuchung nicht auftrat, durch die Gewebebehandlung in dreiwertiges Eisen umgewandelt wurde oder die durchgeführte Turnbells Blau-Reaktion nicht sensitiv genug war.

5.1.3. Berliner Blau-negatives Pigment

Laktoferrin zeigte in der eigenen Untersuchung keine Berliner Blau-positive Reaktion (s. Kapitel 5.1.1.). Zudem gab es keine Hinweise, dass Laktoferrin in den untersuchten Gewebeschnitten eine braune Pigmentierung zeigte (s. Abbildungen 12, 13 und 14, Kapitel 4.2.1.1. sowie Abbildungen 18, 19 und 20, Kapitel 4.2.1.2.). Auch in der Literatur gibt es keine möglichen Angaben über eine Pigmentierung von Laktoferrin, außer dass es in der Milch lachsrosa erscheint (Siebein, 1991).

Berliner Blau-negatives, braunes Pigment (BBn-Pigment) in Makrophagen der Lymphknoten kann Aposiderin, Lipopigment oder Melanin sein (Pearse, 1985). Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie, der Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion, des Bleichens und der Long Ziehl-Neelsen-Reaktion in der eigenen Untersuchung sprechen dafür, dass das BBn-Pigment in den meisten Fällen Lipofuszin und in wenigen Fällen Lipofuszin oder Aposiderin war (Pearse, 1985; s. Kapitel 4.2.2.2.). Bemerkenswert ist, dass das Lipofuszin in der eigenen Untersuchung die für Lipofusazine bekanntesten Eigenschaften Autofluoreszenz nicht zeigte und eine positive Long Ziehl-Neelsen-Reaktion nur vereinzelt zeigte. Zudem ist gerade für Lipofusazine in Makrophagen fehlende Bleichbarkeit und positive Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion beschrieben (Pearse, 1985), was bei dem Lipofuszin in der eigenen Untersuchung nur teilweise (Bleichbarkeit) oder überhaupt nicht (Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion) der Fall war.

Bei dem Pigment, das Lipofuszin oder Aposiderin sein konnte, handelte es sich vermutlich eher auch um Lipofuszin. In der eigenen Untersuchung wurden nur Schnitte gefärbt, die ausschließlich oder wesentlich mehr BBn-Pigment als Hämosiderin enthielten. Von diesen zehn Schnitten zeigten drei Pigment, das Aposiderin oder Lipofuszin sein konnte. In vitro entstandenes Aposiderin ist durch die Verwendung von neutralem gepufferten Formalin ausgeschlossen (Pearse, 1985). Es ist fraglich wie wahrscheinlich und wie häufig eine umfangreiche intravitale Aposiderinbildung, die das gesamte Pigment oder den Großteil des Pigments in Lymphknoten umfasst, ist, da Eisen intravital nur schwer aus Hämosiderin freigesetzt wird (Andrews, 2005). Zudem konnte keine Assoziation des Auftretens von BBn-Pigment mit der Hämosiderinspeicherung in Lymphknoten nachgewiesen

werden (s. Kapitel 4.3.16.).

Lipofuszin, auch als Alterspigment bezeichnet, akkumuliert intrazellulär im Rahmen der Zellalterung (Porta, 2002). Auch in der eigenen Untersuchung konnte zumindest für die oberflächlichen Leistenlymphknoten eine statistisch signifikante Assoziation der Speicherung von BBn-Pigment mit dem Alter gezeigt werden, wobei die Korrelation nicht sehr eng ($r_s = 0,259$) war.

5.2. Ursachen der Pigmentspeicherung

5.2.1. Tumorentwicklung

Die Hämosiderinspeicherung in Mammatumoren ist in vielen Veröffentlichungen beschrieben (Marin-Padilla, 1977; Iancu, 1989b; Choi et al., 2006; Reid-Nicholson et al., 2006). Freitas et al. (2007) vermuten, dass die verstärkte Hämosiderose in Mammatumoren von Mäusen eine erhöhte Eisenverfügbarkeit für die Tumorzellen auf Kosten des gesunden Gewebes zur Folge hat und zu verminderter systemischer Eisenverfügbarkeit führt. Folgende Ergebnisse der eigenen Untersuchung sprechen gegen diese Theorie: Unverändertes Milchdrüsengewebe zeigte signifikant eine stärkere Eisenspeicherung als der Mammatumor des selben Hundes (s. Kapitel 4.3.20.). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied im Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten bei Hunden mit Mammatumoren und Hunden ohne Mammatumoren gezeigt werden (s. Kapitel 4.3.2.). Außerdem konnte eine statistisch signifikante positive Assoziation des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit der Eisenspeicherung im Mammatumor und/oder dem unveränderten Milchdrüsengewebe festgestellt werden (s. Kapitel 4.3.21.). Letzteres deckt sich mit den Beobachtungen von Marin-Padilla (1977) und Dumont et al. (1976), die intratumorale Blutungen mit Hämosiderinspeicherung und verstärkter Hämosiderose des Lymphknotens beschreiben.

Dumont (1976) beschreibt eine Hämosiderose von Makrophagen in Lymphknoten bei

Tumorpatienten unabhängig vom Auftreten von Metastasen in diesen Lymphknoten. Auch in der eigenen Untersuchung konnte kein Zusammenhang zwischen dem Hämosiderosegrad der Lymphknoten und dem Auftreten von Neoplasien in diesen nachgewiesen werden. In der Milz zeigte sich zwar nur knapp keine statistisch signifikante Assoziation zwischen Hämosiderosegrad und dem Auftreten von Neoplasien, allerdings war der Unterschied zwischen Milzen mit und Milzen ohne Neoplasien nicht sehr groß (s. Kapitel 4.3.17.1.).

In der eigenen Untersuchung konnte nur knapp kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Eisenspeicherung in stromalen Makrophagen von Mammatumoren und der Tumorart nachgewiesen werden (s. Kapitel 4.3.23.). Allerdings zeichnete sich kein Unterschied zwischen benignen und malignen Mammatumoren ab. Die Eisenspeicherung in anderen Lokalisationen der Mammatumoren war nicht signifikant mit der Tumorart assoziiert. Diese Ergebnisse decken sich mit den Angaben von Marin-Padilla (1977), Rossiello et al. (1984) und Choi et al. (2006), die Hämosiderin und Ferritin sowohl in benignen als auch in malignen Mammatumoren nachweisen konnten.

5.2.2. Hormonelle Ursachen

Steven und Snook (1975) konnten eine Steigerung der Hämosiderose in der Milz von Ratten durch Östrogenderivate feststellen. Burkhardt (1975) stellte bei Männern einen höheren Hämosideringehalt im Knochenmark fest als bei Frauen. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung ergaben allerdings keine Hinweise auf einen Einfluss von Sexualhormonen auf den Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten und dem Geschlecht, einer Kastration, der Regelmäßigkeit der Läufigkeit, der Zeit seit der letzten Läufigkeit und der Regelmäßigkeit einer Scheinträchtigkeit ermittelt werden (s. Kapitel 4.3.3. - 4. und 4.3.7. - 9.). Allerdings standen für die Auswertung von der Regelmäßigkeit der Läufigkeit, der Zeit seit der letzten Läufigkeit und der Regelmäßigkeit einer Scheinträchtigkeit nur wenige Daten zur Verfügung.

Weitere Informationen über hormonelle Einflüsse (frühere Graviditäten, Abbruch von Graviditäten, Läufigkeitsunterdrückung, weitere Hormonbehandlungen) wurden wegen der geringen Datenmenge nicht statistisch ausgewertet. Würde ein deutlicher Einfluss von Sexualhormonen vorliegen, hätte sich dieser wahrscheinlich, zumindest als statistischer Trend, bei dem Vergleich des Hämosiderosegrades mit Geschlecht oder Kastration gezeigt.

5.2.3. Weitere mögliche Ursachen der Hämosiderinspeicherung

5.2.3.1. *Alter*

Valli (2007) beschreibt einen mit dem Alter variierenden Hämosideringehalt in der Milz und Burkhardt (1975) beobachtete einen Anstieg des Hämosideringehaltes im Knochenmark mit dem Alter. Auch in der eigenen Untersuchung konnte ein Anstieg des Hämosiderosegrades der untersuchten Lymphknoten mit dem Alter gezeigt werden (s. Kapitel 4.3.6.). Dies deckt sich mit der phagozytotischen Funktion (v.a. Erythrophagozytose) der Makrophagen, bei der das freigesetzten Eisen in Form von Hämosiderin gespeichert wird (Rifkind, 1966). Wie lange Hämosiderin bestehen bleibt, ist unklar (Gilliland et al., 2005). Da Hämosiderin aber eine Form der Eisenspeicherung darstellt, aus der Eisen schwer wieder freigesetzt wird (Andrews, 2005), kann es durchaus länger im Gewebe verbleiben. Mit der Zeit würde sich so vermehrt Hämosiderin im Gewebe ansammeln: Je älter die Hunde sind, desto öfter sind sie Situationen des Eisenüberschusses ausgesetzt. Zudem zeigte sich in der eigenen Untersuchung bei adulten Hunden ein höherer Hämosiderosegrad in oberflächlichen Leistenlymphknoten als bei juvenilen Hunden (s. Kapitel 4.3.5.). Da in der eigenen Untersuchung kein hormoneller Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung gezeigt werden konnte (s. Kapitel 5.2.2.), war dieser Unterschied eher auf den Alterseinfluss zurückzuführen.

5.2.3.2. Lokalisation der Lymphknoten sowie Hämosiderosegrad weiterer untersuchter Gewebe

Smith (1958) konnte unterschiedliche Hämosiderosegrade in verschiedenen menschlichen Lymphknoten in Abhängigkeit ihrer Lokalisation finden. Auch in der eigenen Untersuchung konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem Hämosiderosegrad der Lymphknoten und deren Lokalisation (inguinal, iliacal, axillar) im Körper nachgewiesen werden (s. Kapitel 4.3.14.), wobei der mittlere Darmbeinlymphknoten den höchsten Hämosiderosegrad aufwies. Dies könnte auf das große tributäre Gebiet der mittleren Darmbeinlymphknoten, das auch andere Lymphknoten beinhaltet, zurückzuführen sein. Der im Vergleich zu den oberflächlichen Leistenlymphknoten höhere Hämosiderosegrad der Achsellymphknoten ist allerdings unklar.

Zudem zeigte sich in der eigenen Untersuchung eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten und dem der mittleren Darmbeinlymphknoten sowie zwischen dem Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten und dem der Achsellymphknoten (s. Kapitel 4.3.15.). Die positive Korrelation zwischen den Hämosiderosegraden der oberflächlichen Leistenlymphknoten und der mittleren Darmbeinlymphknoten könnte darauf zurückzuführen sein, dass die mittleren Darmbeinlymphknoten Durchgangslymphknoten von den oberflächlichen Leistenlymphknoten erhalten. Wenn die oberflächlichen Leistenlymphknoten eisenreiche Lymphe drainieren, könnte diese auch in die mittleren Darmbeinlymphknoten gelangen und in beiden Lymphknoten eine verstärkte Hämosiderinspeicherung bewirken. Die positive Korrelation zwischen den Hämosiderosegraden der oberflächlichen Leistenlymphknoten und der Achsellymphknoten könnte durch Eisenfreisetzung im gemeinsamen Einzugsgebiet verursacht sein, es könnte aber auf einen systemischen Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung im gesamten Körper hinweisen. Für Letzteres spricht auch, dass der Hämosiderosegrad der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit dem der Kehlgangslymphknoten und dem der Milz signifikant positiv korreliert (s. Kapitel 4.3.15. und 4.3.19.).

5.2.3.3. Entzündung, Hyperämie, Blutung

Hämosiderinhaltige Makrophagen treten im Lymphknoten im Rahmen von Entzündungen, Blutungen und Hyperämien auf (Smith, 1958; Mills, 1989; Andrews, 2005; Fry und McGavin, 2007). Dabei kommt es zur vermehrten Speicherung und verminderten Freisetzung von Eisen aus den Makrophagen (Finch, 1975; Rodriguez et al., 1999). Dumont et al. (1976) beschreiben eine verstärkte Hämosiderose der Lymphknoten bei reaktiver Hyperplasie. Allerdings konnte in der eigenen Untersuchung kein signifikanter Zusammenhang des Auftretens von Entzündungsanzeichen, Hyperämien und Blutungen (neutrophile Granulozyten, follikuläre Hyperplasie, Sinushistiozytose, Hyperämie, Erythrozyten im Sinus oder im Gewebe, Sinusödem) mit dem Hämosiderosegrad der Lymphknoten oder der Milzen nachgewiesen werden (s. Kapitel 4.3.17.3.). Auch Erkrankungen im Einzugsgebiet der oberflächlichen Leistenlymphknoten, die mit vermehrter Freisetzung von Erythrozyten einhergehen (Dermatitis, Verletzungen, Laparotomie, Mammektomie), zeigten knapp keine signifikante Assoziation mit dem Hämosiderosegrad der Lymphknoten (s. Kapitel 4.3.10.). Bei der Untersuchung einer größeren Datenmenge könnte sich hier aber eine statistisch signifikante Assoziation zeigen.

5.2.3.4. Bluttransfusion

Das Auftreten von hämosiderinhaltigen Makrophagen in Lymphknoten nach Bluttransfusionen wird von vielen Autoren beschrieben (Smith, 1958; Mills, 1989; Andrews, 2005; Fry und McGavin, 2007). Laut Smith (1958) konnte Moore (1944) verstärkte Hämosiderose in Lymphknoten nach Bluttransfusionen nachweisen. Smith selbst konnte dies aber nicht bestätigen. Auch in der eigenen Untersuchung konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Hämosiderose von oberflächlichen Leistenlymphknoten und dem Erhalt einer Bluttransfusion nachgewiesen werden (s. Kapitel 4.3.11.).

5.2.3.5. Todesart und Frischegrad

Ein Vergleich des Hämosiderosegrades der oberflächlichen Leistenlymphknoten mit der Todesart und dem Frischegrad des untersuchten Gewebes wurde durchgeführt um agonale und postmortale Einflüsse zu prüfen. Hier konnte kein Zusammenhang gefunden werden (s. Kapitel 4.3.12. - 13.). Auch Betz (1994) konnte keine postmortale Hämosiderinbildung nachweisen.

5.2.3.6. Hämosiderinhaltiges Bindegewebe

Valli (2007 und 2008) ist der Meinung, dass an Bindegewebe gebundenes Hämosiderin der Milz nur bei lang anhaltendem Eisenüberschuss auftritt. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung unterstützen diese Aussage. Hämosiderinhaltiges Bindegewebe der Trabekel trat signifikant häufiger in Lymphknoten und Milzen mit hohem Hämosiderosegrad auf (s. Kapitel 4.3.22.).

5.3. Laktoferrin

Laktoferrin wird in neutrophilen Granulozyten gebildet und kann in diesen immunhistologisch nachgewiesen werden (Siebein, 1991). Griesbeck-Zilch (2008) konnten zeigen, dass auch bovine Epithelzellen der Milchdrüse in vitro Laktoferrin bilden.

In der eigenen Untersuchung konnte keine Laktoferrin-positive Reaktion in neutrophilen Granulozyten caniner Lymphknoten gezeigt werden. Zudem zeigte das Auftreten von Laktoferrin in Makrophagen der Lymphknoten keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Auftreten von neutrophilen Granulozyten in den selben Lymphknoten (s. Kapitel 4.3.25.). Es traten lediglich 2 Lymphknoten mit neutrophilen Granulozyten und Laktoferrin-positiven Makrophagen auf, die beide von dem selben Hund stammten. Zudem zeigte dieser Hund Laktoferrin-positive Makrophagen auch in Lymphknoten, die keine neutrophilen Granulozyten enthielten. Levay und Viljoen (1995) berichten von Antikörpern, die unterschiedlich mit Laktoferrin aus neutrophilen Granulozyten und Laktoferrin aus der Milch reagierten. Laut den Autoren könnte eine

unterschiedliche Reaktion der Antikörper auf Laktoferrine unterschiedlicher Herkunft aber auch auf verschieden eisengesättigte Laktoferrine zurückzuführen sein. Allerdings konnte in der eigenen Untersuchung kein eisenhaltiges Laktoferrin nachgewiesen werden. Möglich wäre, dass der in der eigenen Untersuchung verwendete Antikörper Laktoferrin aus neutrophilen Granulozyten nicht erkannte. Zum einen ist dies aber unwahrscheinlich, da es sich um einen polyklonalen Antikörper gegen menschliches Laktoferrin handelte, der somit nicht sehr spezifisch war. Zum anderen konnte in der eigenen Untersuchung Laktoferrin nicht nur in der Milchdrüse, sondern auch in Kehlgangslymphknoten und Milzen, die sicherlich kein in der Milchdrüse gebildetes Laktoferrin enthielten, nachgewiesen werden.

Kitagawa et al. (2003) und Takeuchi et al. (2004) beschreiben einen Transport von Laktoferrin aus dem Darmlumen über Lymphe in die Lymphknoten. In der eigenen Untersuchung konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Laktoferrin in oberflächlichen Leistenlymphknoten und Laktoferrin im Milchdrüsengewebe und/oder Mammatumor gefunden werden (s. Kapitel 4.3.26.). Zudem zeigte nur ein oberflächlicher Leistenlymphknoten Laktoferrin-positive Lymphe. Dies spricht dafür, dass Laktoferrin aus der Milchdrüse zumindest nicht in größeren Mengen in die regionalen Lymphknoten gelangt.

Laktoferrin konnte in benignen und malignen Mammatumoren nachgewiesen werden (Rossiello et al., 1984; Taniyama et al., 2000). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung, bei der kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Laktoferrin im Mammatumor und der Tumorart gezeigt werden konnte (s. Kapitel 4.3.27.).

5.4. Schlussfolgerungen

Berliner Blau-positives Pigment in Makrophagen von caninen Lymphknoten, Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse war Hämosiderin. Außer Hämosiderin könnte auch Ferritin eine Berliner Blau-positive Reaktion der Lymphe in Lymphknoten, der epithelialen Zellen von Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse sowie des Sekrets von Mammatumoren und unveränderter Milchdrüse verursacht haben. Laktoferrin war nicht an einer Berliner Blau-positiven Reaktion oder Pigmentierung beteiligt. Intrazelluläres, Berliner Blau-negatives, braunes Pigment in Makrophagen caniner Lymphknoten war Lipofuszin, in einigen Fällen möglicherweise auch Aposiderin.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung spiegeln die drainierende, filtrierende und eisenspeichernde Funktion der Lymphknoten, im Rahmen derer es zu einer Steigerung des Hämosideringehalts mit dem Alter kam, wieder. Dabei nahm zum einen das tributäre Gebiet Einfluss. Zum anderen gab es einen allgemeinen systemischen Einfluss auf den Eisengehalt von Lymphknoten und Milz. Ein Einfluss von Sexualhormonen, von Neoplasien in den Lymphknoten oder von Mammatumoren im Milchdrüsengewebe konnte nicht abgeleitet werden. Das Auftreten von Hämosiderin oder Laktoferrin in Mammatumoren war nicht mit der Dignität der Tumoren assoziiert.

6. Zusammenfassung

1. Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von eisenhaltigem goldbraunem Pigment in Makrophagen caniner oberflächlicher Leistenlymphknoten. Weiterhin sollten mögliche Ursachen dieser Pigmentspeicherung hergeleitet werden.
2. Das Untersuchungsgut bestand aus zur Routinediagnostik in das Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen eingesandten Gewebeproben und Tieren. Es umfasste die oberflächlichen Leistenlymphknoten, unverändertes Milchdrüsengewebe und Mammatumoren von 100 Hunden sowie die oberflächlichen Leistenlymphknoten, mittleren Darmbeinlymphknoten, Achsellymphknoten, Kehlganglymphknoten und Milzen von weiteren 100 Hunden ohne Mammatumoren. Zu allen Hunden wurden Fragebogendaten erhoben. Folgende histologische Untersuchungen wurden durchgeführt: Berliner Blau-Reaktion, Turnbells Blau-Reaktion, H.E.-Färbung, Immunhistologie auf Laktoferrin, Fluoreszenzmikroskopie, Schmorls Ferri-Ferrizyanid-Reaktion, Bleichen und Long Ziehl-Neelsen-Reaktion.
3. Bei dem eisenhaltigen goldbraunen Pigment in Makrophagen caniner Lymphknoten handelte es sich um Hämosiderin. Außer Hämosiderin könnte in einigen Lokalisationen von Lymphknoten, Mammatumor und Milchdrüse auch Ferritin eine Berliner Blau-positive Reaktion verursacht haben. Laktoferrin war nicht an einer Pigmentierung oder an einer Berliner Blau-positiven Reaktion beteiligt. Es konnte kein zweiwertiges Eisen mittels Turnbells Blau-Reaktion nachgewiesen werden. Intrazelluläres, Berliner Blau-negatives, braunes Pigment in Makrophagen caniner Lymphknoten war vermutlich Lipofuszin, in einigen Fällen möglicherweise auch Aposiderin.

4. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchung spiegeln die drainierende, filtrierende und eisenspeichernde Funktion der Lymphknoten, im Rahmen derer es zu einer Steigerung des Hämosideringehalts mit dem Alter kam, wieder. Dabei nahm zum einen das tributäre Gebiet Einfluss. Zum anderen gab es einen allgemeinen systemischen Einfluss. Ein Einfluss von Sexualhormonen, von Neoplasien in den Lymphknoten oder von Mammatumoren im Milchdrüsengewebe konnte nicht hergeleitet werden. Das Auftreten von Hämosiderin oder Laktoferrin in Mammatumoren war nicht mit der Dignität der Tumoren assoziiert.

7. Summary

1. Aim of this study was to identify the iron positive gold brown pigment in the macrophages of canine superficial inguinal lymph nodes and the possible reasons for this pigmentation.
2. The examined tissues were collected from the routine diagnostic material of the Institut für Veterinär-Pathologie of the Justus-Liebig-Universität in Gießen. They consisted of superficial inguinal lymph nodes, mammary tumors and physiologic mammary tissues from 100 dogs, as well as of superficial inguinal lymph nodes, axillary lymph nodes, medial iliac lymph nodes and spleen from another 100 dogs without mammary tumors. Auxiliary data from all dogs were collected. Following histological examinations were accomplished: Prussian blue, Turnbells blue, H.E., immunohistochemistry for lactoferrin, fluorescence microscopy, Schmorl's reaction, bleaching and long Ziehl-Neelsen.
3. The Prussian blue-positive gold brown pigment in macrophages of canine lymph nodes was identified as hemosiderin. Ferritin may also have been involved in the Prussian blue-positive reactions of some areas in lymph nodes, mammary tumors and physiologic mammary tissues. There was no evidence for lactoferrin being involved in any pigmentation or Prussian blue-positive reaction. Ferrous iron could not be detected by means of Turnbells blue. Prussian blue-negative brown pigment in macrophages of canine lymph nodes presumably was lipofuscin, in some cases possibly also aposiderin.
4. The results of this study reflect the draining, filtrating and iron storage function of lymph nodes, showing the contents of hemosiderin rising with age. The hemosiderosis of lymph nodes is influenced by the draining area. On the other hand, general systemic factors seem to also influence the degree of

hemosiderosis. There was no evidence for an influence of sex hormones, of neoplasia in the lymph node or of mammary tumors on hemosiderosis. The presence of hemosiderin or lactoferrin in mammary tumors showed no significant association with the degree of malignancy of these tumors.

8. Literaturverzeichnis

ALVAREZ-HERNANDEZ, X., FELSTEIN, M.V., BROCK, J.H., 1986. The relationship between iron release, ferritin synthesis and intracellular iron distribution in mouse peritoneal macrophages. Evidence for a reduced level of metabolically available iron in elicited macrophages. *Biochem. Biophys. Acta* 886, 214-222

ANDREWS, N.C., 2005. Molecular control of iron metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 18, 159-169

BETZ, P., 1994. Histological and enzyme histochemical parameters for the age estimation of human skin wounds. *Int. J. Legal Med.* 107, 60-68

BIRGENS, H.S., 1994. The monocytic receptor for lactoferrin and its involvement in lactoferrin-mediated iron transport. *Adv. Exp. Med. Biol.* 357, 99-109

BRETON, M., MARILLER, C., BENAÏSSA, M., CAILLAUX, K., BROWAEYS, E., MASSON, M., VILAIN, J-P., MAZURIER, J., PIERCE, A., 2004. Expression of delta-lactoferrin induces cell cycle arrest. *Biometals* 17, 325-329

BRUNK, U.T., TERMAN, A., 2002. Lipofuscin: mechanism of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 611-619

BURKHARDT, R., 1975. Iron overload of bone marrow and bone. In: Kief, H. (Hrsg.), *Iron metabolism and its disorders. Workshop Conferences Hoechst* 3, 264-271

CHIANCONE, E., CECI, P., ILARI, A., RIBACCHI, F., STEFANINI, S., 2004. Iron and proteins for iron storage and detoxification. *Biometals* 17, 197-202

CHOI, Y.D., GONG, G.Y., KIM, M.J., LEE, J.S., NAM, J.H., JUHNG, S.W., CHOI, C., 2006. Clinical and cytological features of the papillary neoplasms of the breast. *Acta Cytol.* 50, 35-40

CRICHTON, R.R., 1975. Ferritin: structure, function and role in intracellular iron metabolism. In: Kief, H. (Hrsg.), *Iron metabolism and its disorders. Workshop Conferences Hoechst* 3, 81-88

CRICHTON, R.R., WARD, R.J., 1992. Iron metabolism - new perspectives in view. *Biochemistry* 31, 11255-11264

DAYAN, D., ABRAHAMI, I., BUCHNER, A., GORSKY, M., CHIMOVITZ, N., 1988. Lipid pigment (lipofuscin) in human perioral muscles with aging. *Exp. Gerontol.* 23, 97-102

DUMONT, A.E., FORD, R.J., BECKER, F.F., 1976. Siderosis of lymph nodes in patients with Hodgkin's disease. *Cancer* 38, 1247-1252

FINCH, C.A., 1975. Introductory remarks: reticuloendothelial vs. parenchymal storage. In: Kief, H. (Hrsg.), *Iron metabolism and its disorders. Workshop Conferences Hoechst* 3, 201-202

FREITAS, I., BONCOMPAGNI, E., VACCARONE, R., FENOGLIO, C., BARNI, S., BARONZIO, G.F., 2007. Iron accumulation in mammary tumors suggests a tug of war between tumor and host for the microelement. *Anticancer Res.* 27, 3059-3065

FRY, M.M., MCGAVIN, M.D., 2007. Bone marrow, blood cells, and lymphatic system. In: McGavin, M.D., Zachary, J.F., Pathologic basis of veterinary disease, Verlag Mosby, St. Louis, 808-829

GAO, G., JOHANSSON, U., RUNDQUIST, I., OLLINGER, K., 1994. Lipofuscin-induced autofluorescence of living neonatal rat cardiomyocytes in culture. Mech. Ageing Dev. 73, 79-86

GEDIGK, P., STRAUSS, G., 1954. Zur formalen Genese der Eisenpigmente. Virchows Arch. 326, 172-190

GILLILAND, M.G.F., FOLBERG, R., HAYREH, S.S., 2005. Age of retinal hemorrhages by iron detection: an animal model. Am. J. Forensic Med. Pathol. 26, 1-4

GOESSNER, W., 1953. Histochemischer Nachweis einer organischen Trägersubstanz im Hämosiderinpigment. Virchows Arch. 323, 685-693

GÖMÖRI, G., 1936. Microtechnical demonstration of iron. Am. J. Pathol. 12, 655-664

GREEN, M.R., PASTEWKA, J.V., 1978. Lactoferrin is a marker for prolactin response in mouse mammary explants. Endocrinology 103, 151-103

GREEN, R., ESPARZA, I., SCHREIBER, R., 1988. Iron inhibits the nonspecific tumoricidal activity of macrophages. In: WEINTRAUB, L.R., EDWARDS, C.Q., KRIKKER, M. (Hrsg.), Hemochromatosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 526, 301-309

GRIESBECK-ZILCH, B., MEYER, H.H., KÜHN, C.H., SCHWERIN, M., WELLNITZ, O., 2008. Staphylococcus aureus and Escherichia coli cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. J. Dairy Sci. 91, 2215-2224

HAMPE, J.F., MISDORP, W., 1974. Tumors and dysplasias of the mammary gland. Bull. Wld. Hlth. Org. 50, 111-133

HARMAN, D., 1989. Lipofuscin and ceroid formation: the cellular recycling system. Adv. Exp. Med. Biol. 266, 3-15

HARRISON, P.M., AROSIO, P., 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage and cellular regulation. Biochem. Biophys. Acta 1275, 161-203

IANCU, T.C., 1989a. Ultrastructural pathology of iron overload. Baillieres Clin. Haematol. 2, 475-495

IANCU, T.C., 1989b. Iron and neoplasia: ferritin and hemosiderin in tumor cells. Ultrastruct. Pathol. 13, 573-584

IANCU, T.C., SHILOH, H., 1988. Experimental iron overload. In: WEINTRAUB, L.R., EDWARDS, C.Q, KRIKKER, M. (Hrsg.), Hemochromatosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 526, 164-178

IANCU, T.C., SHILOH, H., 1994. Morphologic observations in iron overload: an update. Adv. Exp. Med. Biol. 356, 255-265

KELLNER, U., KELLNER, S., WEINITZ, S., 2008. Chloroquine retinopathy: lipofuscin- and melanin-related fundus autofluorescence, optical coherence tomography and multifocal electroretinography. *Doc. Ophthalmol.* 116, 119-127

KIKUCHI, M., MIZOROKI, S., KUBO, T., OHIWA, Y., KUBOTA, M., YAMADA, N., ORINO, K., OHNAMI, Y., WATANABE, K., 2003. Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 679-684

KITAGAWA, H., YOSHIZAWA, Y., YOKOYAMA, T., TAKEUCHI, T., TALUKDER, M.J.R., SHIMIZU, H., ANDO, K., HARADA, E., 2003. Persorption of bovine lactoferrin from the intestinal lumen into the systemic circulation via the portal vein and the mesenteric lymphatics in growing pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 567-572

KONTTINEN, Y.T., REITAMO, S., 1979. Effect of fixation on the antigenicity of human lactoferrin in paraffin-embedded tissues and cytocentrifugated cell smears. *Histochemistry* 62, 55-64

LEAK, L.V., 1976. The structure of lymphatic capillaries in lymph formation. *Fed. Proc.* 35, 1863-1871

LEE, F.-Y., LEE, T.-S., PAN, C.-C., HUANG, A.-L., CHAU, L.-Y., 1998. Colocalization of iron and ceroid in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 138, 281-288

LEVAY, P.F., VILJOEN, M., 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* 80, 252-267

LILLIE, R.D., 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry, McGraw-Hill Book Company, New York, Toronto, Sydney, und London, 398, 399

LILLIE, R.D., FULLMER, H.M., 1976. Histopathologic technic and practical histochemistry, McGraw-Hill Book Company, New York, 501-503

LISTINSKY, C.M., 1988. Common reactive erythrophagocytosis in axillary lymph nodes. Am. J. Pathol. 90, 189-192

MARIN-PADILLA, M., 1977. Erythrophagocytosis by epithelial cells of a breast carcinoma. Cancer 39, 1085-1089

MASON, D.Y., TAYLOR, C.R., 1978. Distribution of transferrin, ferritin and lactoferrin in human tissues. Am. J. Clin. Pathol. 31, 316-327

MASSON, P.L., HEREMANS, J.F., 1971. Lactoferrin in milk from different species. Comp. Biochem. Physiol., B 39, 119-129

MEGURO, R., ASANO, Y., ODAGIRI, S., LI, C., IWATSUKI, H., SHOUMURA, K., 2005. The presence of ferric and ferrous iron in the nonheme iron store of resident macrophages in different tissues and organs: histochemical demonstration by the perfusion-Perls and -Turnbull methods in the rat. Arch. Histol. Cytol. 68, 171-183

MISDORP, W., ELSE, R.W., HELLMEN, E., LIPSCOMB, T.P., 1999: Histological classification of mammary tumors of the dog and cat. The armed forces institute of pathology in cooperation with the american registry of pathology and the world health organization collaborating center for worldwide reference on comparative oncology, Washington, D. C., 16-23

MILLS, J.N., 1989. Lymph node cytology. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 19, 697-717

NEUMANN, E., 1888. Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Pigmente. Virchows Archiv 111, 25-47

NICKEL, R., SCHUMMER, A., SEIFERLE, E., 2005. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band III, Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane, Parey Verlag, Stuttgart, 352-365

PAKKANEN, R., AALTO, J., 1997. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. Int. Dairy J. 7, 285-297

PARMLEY, R.T., SPICER, S.S., ALVAREZ, C.J., 1978. Ultrastructural localization of nonheme cellular iron with ferrocyanide. J. Histochem. Cytochem. 26, 729-741

PATSIKAS, M.N., DESSIRIS, A., 1996a. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part I: the 1st, 2nd, 4th and 5th mammary glands. Anat. Histol. Embryol. 25, 131-138

PATSIKAS, M.N., DESSIRIS, A., 1996b. The lymph drainage of the mammary glands in the bitch: a lymphographic study. Part II: the 3rd mammary gland. Anat. Histol. Embryol. 1996 25, 139-143

PEARSE, A.G.E., 1985. Histochemistry theoretical and applied, Vol. 2: analytical technology, Verlag Churchill, Livingstone, Edinburgh, London, Melbourne und New York, 879-913, 974

PEREIRA, C.T., RAHAL, S.C., DE CARVALHO BALIEIRO, J.C., RIBEIRO, A.A.C.M., 2003. Lymphatic drainage in healthy and neoplastic mammary glands in female dogs: can it really be altered? *Anat. Histol. Embryol.* 32, 282-290

PORTA, E.A., 2002. Pigments in aging: An overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 959, 57-65

REID-NICHOLSON, M.D., TONG, G., CANGIARELLA, J.F., MOREIRA, A.L., 2006. Cytomorphologic features of papillary lesions of the male breast: a study of 11 cases. *Cancer* 108, 222-230

RICHTER, G.W., 1978. The iron-loaded cell - The cytopathology of iron storage. A review. *Am. J. Pathol.* 91, 362-404

RIFKIND, R.A., 1965. Heinz body anemia: an ultrastructural study. II. Red cell sequestration and destruction. *Blood* 26, 433-448

RIFKIND, R.A., 1966. Destruction of injured red cells in vivo. *Am. J. Med.* 41, 711-723

RODRIGUEZ, M.C., PUY SAIZ, M., CARBONELL, T., MITJAVILA, M.T., 1999. Local and systemic responses to iron-dextran injected into a granuloma pouch in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 134, 42-48

ROMEIS, B., 1989. *Mikroskopische Technik*, Verlag Urban und Schwarzenberg, München und Wien, 396-400, 424

ROSSIELLO, R., CARRIERO, M.V., GIORDANO, G.G., 1984. Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue. *J. Clin. Pathol.* 37, 51-55

SCHNELL, S.A., STAINES, W.A., WESSENDORF, M.W., 1999. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *J. Histochem. Cytochem.* 47, 719-730

SHTERMAN, N., KUPFER, B., MOROZ, C., 1991. Comparison of transferrin receptors, iron content and isoform profile in normal and malignant human breast cancer cell lines. *Pathobiology* 59, 19-25

SIEBEIN, R., 1991. Histochemische, enzym- und immunhistochemische Darstellung reifer neutrophiler Granulozyten des Hundes im Licht- und Elektronenmikroskop. *Vet. Med. Diss., München*, 28, 38

SMITH, F., 1958. Erythrophagocytosis in human lymph-glands. *J. Pathol. Bacteriol.* 76, 383-392

STEVEN, W.M., SNOOK, T., 1975. The stimulatory effects of diethylstilbestrol and diethylstilbestroldiphosphate on the reticuloendothelial cells of the rat spleen. *Am. J. Anat.* 144, 339-359

SUZUKI, Y.A., LONNERDAL, B., 2002. Characterization of mammalian receptors for lactoferrin. *Biochem. Cell Biol.* 80, 75-80

TAKAHASHI, M., IWATA, S., UCHIDA, K., FUJIWARA, H., 1988. The pathological study of enterosiderosis in guinea pigs. *Jikken Dobutsu.*, 37, 171-177

TAKEUCHI, T., KITAGAWA, H., HARADA, E., 2004. Evidence of lactoferrin transportation into blood circulation from intestine via lymphatic pathway in adult rats. *Exp. Physiol.* 89, 263-270

TANIYAMA, H., KITAMURA, A., KAGAWA, Y., HIRAYAMA, K., YOSHINO, T., KAMIYA, S., 2000. Localized amyloidosis in canine mammary tumors. *Vet. Pathol.* 37, 104-107

TENG, C.T., PENTECOST, B.T., CHEN, Y.H., NEWBOLD, R.R., EDDY, E.M., MCLACHLAN, J.A., 1989. Lactotransferrin gene expression in the mouse uterus and mammary gland. *Endocrinology* 124, 992-999

TRUMP, B.F., VALIGORSKY, J.M., ARSTILA, A.U., MERGNER, W.J., 1975. A concept of cellular iron metabolism and iron overload. In: Kief, H. (Hrsg.), *Iron metabolism and its disorders. Workshop Conferences Hoechst* 3, 201-202

VALLI, T., 2007. Hematopoietic system. In: Maxie, M.G. (Hrsg.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of domestic animals*, Verlag Saunders Elsevier, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto, 277-291

VALLI, T., 2008. Persönliche Mitteilung vom 20.08.2008 per email.

WARD, P.P., CONNEELY, O.M., 2004. Lactoferrin: role in iron homeostasis and host defense against microbial infection. *Biometals* 17, 203-208

WEINBERG, E.D., 1999. Iron loading and disease surveillance. *Emerging Infect. Dis.* 5, 346-352

YAMADA, Y., SATO, R., KOBAYASHI, S., HANKANGA, C., INANAMI, O., KUWABARA, M., MOMOTA, Y., TOMIZAWA, N., YASUDA, J, 2008. The antiproliferative effect of bovine lactoferrin on canine mammary tumor cells. J. Vet. Med. Sci. 70, 443-448

YUAN, X.M., LI, W., BAIRD, S.K., CARLSSON, M., MELEFORS, O., 2004. Secretion of ferritin by iron-laden macrophages and influence of lipoproteins. Free Radic. Res. 38, 1133-1142

9. Anhang

9.1. Lösungen, Puffer und Bezugsquellen

9.1.1. Lösungen und Puffer

– Neutrales gepuffertes Formalin

1. Lösen von 4 g Natriumdihydrogenphosphat (Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse; E. Merck, Darmstadt) und 6,5 g Dinatriumhydrogenphosphat (Natriumdihydrogenphosphat cryst. purum p.a.; Sigma-Aldrich-Laborchemie, Seelze) in 900 ml Aqua dest.
2. Zugabe von 100 ml Formalin
3. Einstellen des pH-Werts auf pH 7,0 durch weitere Zugabe von Natriumdihydrogenphosphat oder Dinatriumhydrogenphosphat

– Ammoniumpolysulfidlösung

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Institut für Anorganische und Analytische Chemie des Fachbereichs Biologie und Chemie, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Herr Dr. B. Commerscheidt)

1. Sättigung von 37,5 ml konzentrierter Ammoniaklösung (NH_3) mit Schwefelwasserstoffgas (H_2S) in der Kälte
2. Zugabe von 62,5 ml konzentrierter Ammoniaklösung
3. Zugabe von 2,5 g elementaren Schwefel
4. Auffüllen ad 250 ml mit Aqua dest.

– Tris-buffered Saline (TBS, pH 7,6)

1. Herstellung der Stammlösung aus 60,75 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 610 ml Aqua dest. und 390 ml 1 N HCl

2. Herstellung der Gebrauchslösung aus 100 ml Stammlösung und 900 ml 0,8 % NaCl in Aqua dest.

3. Einstellen des pH-Wertes auf pH 7,6 mit 1 N NaOH bzw. 1 N HCl

– 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,8

Lösen von 0,5874 g Dinatriumhydrogenphosphat und 0,9361 g Natriumdi-hydrogenphosphat in 93 ml Aqua dest.

– Zitratpuffer (10 mM, pH 6,0)

1. Herstellung der Stammlösung A (0,1 M Zitronensäure) aus 21,01 g Zitronen-säure und 1000 ml Aqua dest.

2. Herstellung der Stammlösung B (0,1 M Natriumzitrat) aus 29,41 g Trinatrium-zitrat und 1000 ml Aqua dest.

3. Lagerung der Stammlösungen bei 2-8 °C

4. Herstellung der Gebrauchslösung aus 9 ml Stammlösung A, 41 ml Stammlösung B und 450 ml Aqua dest.

5. Einstellen des pH-Werts auf pH 6,0 mit 0,1 M HCl

9.1.2. Bezugsquellen

- Ammoniumsulfat: Ammoniumsulfat puriss. p. a.; Fluka Feinchemikalien, jetzt Sigma-Aldrich-Laborchemie, Seelze
- BCATM Protein Assay Kit; Pierce, Rockford, USA; freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere des Fachbereichs Veterinärmedizin, Justus-Liebig-Universität, Gießen, Herr Dr. W. Herbst
- Bovines Serumalbumin: Bovine serum albumin; Dianova, Hamburg

- Coverplates™: Life Science International, Frankfurt/Main
- Dinatriumhydrogenphosphat: Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat zur Analyse; E. Merck, Darmstadt
- Einbettungsautomaten: Tissue Tek® Vacuum Infiltration Processor; Vogel GmbH & Co KG, Gießen
- Eindeckautomat: TissueTec® Mod. 4765; Vogel GmbH & Co KG, Gießen
- Eisen(III)chlorid-Lösung: Eisen(III)chlorid-Lösung, 15 % Fe; E. Merck, Darmstadt
- Essigsäure: Essigsäure Rotipuran® > 99,6 %; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- Fluoreszenzfilter: Filtersatz 09; Carl Zeiss AG, Jena
- Fluoreszenzmikroskop: Zeiss Axioplan 2, Objektive: Zeiss Plan-Neofluar, Leuchte: HBO 100; Carl Zeiss AG, Jena
- Formalin: Formaldehyd säurefrei > 36 %; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- H₂O₂: Perhydrol® 30 % H₂O₂ p.a.; E. Merck, Darmstadt
- Isopropanol: Isopropanol; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- Kaliumhexacyanoferrat-II: Kaliumhexacyanoferrat [II]-Trihydrat > 99 %, krist.; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- Kaliumhexacyanoferrat-III: Kaliumhexacyanoferrat [III] zur Analyse; E. Merck, Darmstadt
- Kaliumdisulfid: Kaliummetabisulfid; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
- Karbolfuchsin-Lösung: Carbol-Fuchsin-Lösung (Fuchsin-Phenol-Lösung); Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
- Kernechtrot: Kernechtrot-Aluminiumsulfat-Lösung (Kernechtrot-RL); Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig
- Mayers Häkalaun: Mayers Häkalaunlösung; E. Merck, Darmstadt
- Methanol: Methanol Rotipuran® ≥ 99,8 % p.a.; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

- NaCl: NaCl krist.; E. Merck, Darmstadt
- NaOH: NaOH 1M (Plätzchen); E. Merck, Darmstadt
- Natriumdihydrogenphosphat: Natriumdihydrogenphosphat cryst. purum p.a.; Fluka Feinchemikalien, jetzt Sigma-Aldrich-Laborchemie, Seelze
- Papanicolaous Hämatoxylin: Papanicolaou 1b; E. Merck, Darmstadt
- Paraffin: Histo-Comp® Gewebeeinbettmittel; Vogel GmbH & Co KG, Gießen; Schmelzpunkt 56-58 °C
- Plastikküvetten: Plastikküvetten Typ 1013; Gesellschaft für Labortechnik GmbH (GfL), Burgwedel
- Salzsäure: Salzsäure 2M; Fisher Scientific UK Limited, Loughborough, Leicestershire, Großbritannien
- Säule: PD-10 Desalting column; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
- SuperFrost®Plus-Objektträger: Menzel Gläser, Braunschweig
- Trinatriumzitat: Trinatriumzitat x H₂O; E. Merck, Darmstadt
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; Fluka Feinchemikalien, jetzt Sigma-Aldrich-Laborchemie, Seelze
- Xylol-Ersatz: Roti-Histol®; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
- Zentrifuge: Hettich Rotina 48 RC, Bäch, Schweiz
- Zitronensäure: Zitronensäure x H₂O; Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

9.2. Tabellarische Erfassung aller Daten

Alle Fragebogendaten der Fälle und Kontrollen sowie alle Ergebnisse der histologischen Untersuchungen sind in den nachfolgenden Tabellen 45 und 46 aufgeführt. Der Tabellenschlüssel ist in Kapitel 9.2.3. zu finden.

9.2.1. Tabellarische Erfassung aller Daten der Fälle (Hunde mit Mammatumoren)

Tabelle 45: Tabellarische Erfassung aller Daten der Fälle

Nr	T-Nr	Ras	Alt	Ge	Ge.r	Lä	Zlä	Gra	St	Lu	Agra	Ho	Er	Sys	Bl	Weil	lubMs	lubBd	lubBn	lubNeo	lubnp	lubWei
1	T2126/05	64	10	1	2																	
2	T2128/05	77	7	1	2	1		0	0	0	0		0	0	0							
3	T2145/05	54	12	1	2			0	2	0	0		0									
4	T2327/05	82	12	1	2	1		1	0	0	0		1	0	0	1	10	0	4	0	0	0
5	T2356/05	54	7	1	2																	
6	T2379/05	42	11	1	2	1	4	0	2	0	0	0	1	0	0							
7	T2393/05	28	7	1	2	1	4	0	0	0	0	0	1	0								
8	T2442/05	64	11	1	2																	
9	T2461/05	76	13	1	2			0	1	0	0	0	1	0	0							
10	T2486/05	53	10	1	2		4	0	1													
11	T2624/05	19	12	1	2																	
12	T2653/05	81	12	1	2												30	0	0	0	0	4
13	T2658/05	78	12	1	2																	
14	T2672/05	54	9	2	2			0			0	0	1	0	0							
15	T2677/05	41	9	2	2			0			0	0	1	0	0							
16	T2697/05	28	7	1	2	1		0	0	0	0	1	1	0	0							
17	T2699/05	64	10	1	2	1		0	1	0	0	0	0	0	0							
18	T2761/05	14	10	1	2	2	2	0	0	0	0		0									
19	T2835/05	30	10	1	2			0	0	0	0	0	0	0	0							
20	T2892/05	54	13	2	2								1									
21	T2923/05	84	5	1	2			0	0	0	0	0	0	0	0							
22	T2927/05	54	8	1	2			0	0	2	0		0	0	0							
23	T2993/05	82	9	1	2	1		0	2	0	0		0	0	0							
24	T3070/05	82	6	1	2			0	2	1	0	0	0	0	0							
25	T3092/05	58	7	1	2			0	0	1	0	0	0	0	0							
26	T3104/05	41	10	2	2			0			0	0	1	0	0							
27	T3156/05	2	11	2	2			0			0		1									
28	T3176/05	28	5	1	2			0	0	0	0				0							
29	T3195/05	73	10	1	2	1	3	0	1	0	0	0	0	0	0	2						
30	T3213/05	16	7	1	2				0	1	0	0	1	0	0							
31	T3228/05	54	7	1	2			0	1	0	0											
32	T3267/05	54	7	1	2				2	2			1									
33	T3365/05	54	8	1	2			0	0	1	0	0	0	0	0							
34	T3371/05	54	9	1	2																	
35	T3415/05	84	9	1	2			0	0	0	0	0	0	0	0							
36	T3442/05	9	10	1	2	1	6	1	1	0	0	0	0	0	0							
37	T3458/05	54	13	2	2								1									
38	T3539/05	82	12	1	2																	
39	T3624/05	30	7	1	2																	
40	T3667/05	20	6	1	2	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0							
41	T3691/05	38	9	1	2			0		1	0											
42	T3741/05	21	12	1	2	1	12	0	1	2	0		0	0	0							
43	T3765/05	17	10	1	2	1		0	2	0	0	0	0	0	0							
44	T3780/05	17	15	1	2	1	10	1	2	0	1	5										
45	T3843/05	28	7	1	2	1	14	0	2	0	0	0	0	0	0							
46	T3878/05	38	10	1	2	1		0	0	0	0		0	0	0		0,1	0	5	0	0	0
47	T3915/05	64	9	1	2	1	10	0	1	0	0	0	0	0	0							
48	T3957/05	82	13	1	2	1	3	0	0	0	0	0	1	0	0							
49	T3990/05	12	8	1	2	1		0	0	0	0		0	0	0							
50	T4019/05	54	11	2	2			0			0		1	0	0							

Fortsetzung 1 Tabelle 45

Nr	II _{Ms}	II _{Bd}	II _{Bn}	II _{Neo}	II _{np}	II _{Lf}	II _{Wei}	Ir _{Ms}	Ir _{Bd}	Ir _{Bn}	Ir _{Neo}	Imp	Ir _{Lf}	Ir _{Wei}	T1A	T1BpSt	T1BpD
1								30	0	4	0	0	0	0	2	0	0
2								10	0	0	0	0		8	3	0	0
3	10	0	0	0	0		1								7	2	0
4															1	0	0
5	10	0	2	0	0	0	4								5	0	0
6	0,1	0	3	0	0		8								4	0	0
7	1	0	0	0	0		8								6	0	0
8	10	1	0	0	0	0	4								5	0	0
9	30	1	0	0	0	1	0								5	1	0
10	0,1	0	0	0	0	0	8								3	0	0
11								20	0	0	0	0	0	0	7	0	0
12															5	0	0
13								40	0	0	0	0	0	4	4	0	0
14	30	0	4	0	0		4								4	1	0
15								40	0	0	0	0	0	0	5	0	0
16								20	0	1	0	0		0	2	1	0
17								1	0	0	0	0	0	6	4	0	0
18	0	0	0	0	0		0								4	4	0
19	0,1	0	0	0	0	0	0								5	0	0
20	10	0	0	0	0	0	8								5	1	0
21	0	0	1	0	0		0								5	1	0
22	0	0	0	0	0	1	8								6	0	0
23	1	0	0	0	0		8								7	1	0
24	0	0	0	0	0	0	4								2	0	0
25								0,1	0	0	0	0		1	4	1	0
26								20	0	0	0	0	0	6	4	5	0
27	0	0	0	0	0	0	0								2	1	0
28								20	0	0	0	0		1	4	4	0
29	0,1	0	3	0	0	0	6								4	0	0
30								20	0	1	0	0	0	8	8	5	0
31								0,1	0	0	0	0		1	5	1	0
32								50	0	0	0	0	0	1	2	1	0
33								10	0	0	0	0	0	8	2	0	0
34								0,1	0	4	0	0	0	1	4	1	0
35								0,1	0	0	0	0	0	4	4	0	0
36	1	0	0	0	0		8								3	2	0
37								10	0	4	0	0	0	4	5	0	0
38	0,1	0	0	0	0	0	0								3	0	0
39	30	0	1	0	0		8								7	5	0
40	20	0	4	0	0		0								7	0	0
41								20	0	0	0	0		8	2	0	0
42	30	0	3	0	0	0	1								4	2	0
43	30	0	3	0	0	0	4								2	1	0
44								1	0	0	0	0	0	0	4	1	0
45								70	0	0	0	0	0	4	3	0	0
46															4	1	0
47	0,1	0	0	0	0		6								2	0	0
48								0	0	0	0	0		8	2	0	0
49	70	1	0	0	0	0	0								4	1	0
50	10	0	0	0	0		1								4	0	0

Fortsetzung 2 Tabelle 45

Nr	T1BpZ	T1BpSe	T1LfD	T1LfZ	T1LfSe	T2A	T2BpSt	T2BpD	T2BpZ	T2BpSe	T2LfD	T2LfZ	T2LfSe	T3A
1	0	0	0	0	1									
2	3	0												
3	0	0				3	2	0	0	0				
4	0	0				3	2	0	0	0				
5	0	0				1	1	0	0	0	0	0	1	
6	0	0				3	1	0	0	0				
7	0	0				4	0	0	0	0				
8	0	0	0	0	0									
9	0	0	0	0	0									
10	0	0				1	0	0	0	0	0	0	0	
11	0	0	0	0	0									
12	0	0				4	3	0	0	0				2
13	0	0	1	1	1									
14	0	1				2	0	0	0	0				
15	0	0	0	0	1									
16	0	0				2	0	0	0	0				
17	0	0				2	1	0	0	0				5
18	0	0				4	0	0	0	0				2
19	0	0	0	0	0									
20	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
21	0	0												
22	0	0	0	0	0									
23	0	0												
24	0	0				1	0	0	0	0				3
25	0	0												
26	1	0	0	1	1	4	2	0	1	1				
27	0	1				2	1	0	0	0	0	0	0	
28	0	1				4	3	0	0	0				4
29	0	0				1	0	1	1	0	0	0	0	9
30	0	0	0	0	0									
31	0	0				2	0	0	0	0				2
32	0	0	0	0	0									
33	0	0	0	0	1									
34	0	0	0	1	1									
35	0	0	0	0	1									
36	0	0												
37	0	0	0	0	1									
38	0	0	0	0	0									
39	3	1												
40	0	0												
41	0	0				2	1	0	0	0				4
42	0	0	0	0	0									
43	0	0				0	1	0	0	0	0	0	1	9
44	0	0				7	1	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	1	1	2
46	0	0												
47	0	0												
48	0	0				4	2	0	0	0				3
49	0	0	0	1	1									
50	0	0												

Fortsetzung 3 Tabelle 45

Nr	T3BpSt	T3BpD	T3BpZ	T3BpSe	T3LfD	T3LfZ	T3LfSe	T4A	T4BpSt	T4BpD	T4BpZ	T4BpSe	T5A	T5BpSt
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12	0	0	0	1				2	1	0	0	0	2	4
13														
14														
15														
16														
17	1	0	0	0	0	0	0							
18	3	0	1	0										
19														
20														
21														
22														
23														
24	0	0	0	0	0	0	0							
25														
26														
27														
28	3	0	0	1				4	5	0	0	1	5	1
29	0	0	0	0										
30														
31	3	3	0	3										
32														
33														
34														
35														
36														
37														
38														
39														
40														
41	0	0	0	0										
42														
43	0	0	0	0				4	1	0	0	0		
44	1	0	0	0	0	0	1							
45	0	0	0	0										
46														
47														
48	1	0	0	0										
49														
50														

Fortsetzung 4 Tabelle 45

Nr	T5BpD	T5BpZ	T5BpSe	T6A	T6BpSt	T6BpD	T6BpZ	T6BpSe	MmBpSt	MmBpD	MmBpZ	MmBpSe	MmLfSe
1									0	0	0	0	0
2													
3													
4									2	0	0	0	
5									4	0	1	0	0
6									0	0	0	0	
7									2	0	0	0	
8									0	0	0	0	0
9									0	0	0	0	0
10									0	0	0	0	
11									4	0	0	3	0
12	0	0	0						4	3	2	3	
13									4	0	0	1	0
14									3	1	0	1	
15									2	0	0	0	0
16									2	0	1	1	
17									3	0	0	0	0
18									3	0	0	0	
19									0	0	0	0	0
20									2	0	0	0	0
21													
22													
23									3	0	0	1	
24									2	0	0	0	0
25									1	0	0	0	
26									4	0	0	1	
27													
28	0	0	0						3	0	0	0	
29									4	0	0	0	0
30													
31									1	0	0	0	
32									2	0	0	0	
33									3	2	0	4	0
34									1	0	0	0	
35									2	0	0	0	
36									0	0	0	0	
37									0	0	0	0	0
38									1	0	0	0	0
39									5	0	0	3	
40									3	0	0	0	
41									0	0	0	0	
42													
43									1	0	0	0	0
44									0	0	0	0	
45									1	0	0	0	
46									0	0	0	0	
47									3	0	0	0	
48									1	0	0	0	
49									1	0	0	1	
50									0	0	0	0	

Fortsetzung 5 Tabelle 45

Nr	T-Nr	Ras	Alt	Ge	Ge.r	Lä	Zlä	Gra	St	Lu	Agra	Ho	Er	Sys	Bl	Wei	lubMs	lubBd	lubBn	lubNeo	lubnp	lubWei
51	T4024/05	54	12	1	2	1	12	0	2	0	0	0	0	0	0	3						
52	T4028/05	67	11	2	2			0			0	0	1	0	0							
53	T4150/05	1	8	1	2								1									
54	T4171/05	28	6	1	2	1	2	0	0	0	0		0									
55	T4195/05	57	11	1	2	1			1	0	0											
56	T4238/05	36	12	1	2	2	12	0	2	0	1	5	1	0	0							
57	T4241/05	71	7	2	2								1				70	0	0	0	0	8
58	T4251/05	27	10	1	2			0	0	0	0											
59	T4299/05	34	10	1	2	2		0	2	0	0	2	1	0	0							
60	T4395/05	84	9	1	2	1	12	0	2	0	0	0	0	0	0							
61	T4445/05	54	8	1	2				1		0		1									
62	T5110/05	21	10	1	2			0		0		0	0	0	0							
63	T5152/05	61	11	1	2			0	0	0	0											
64	T5157/05	70	6	1	2			0	2	0	0	0	1	0	0							
65	T5220/05	28	7	1	2	2	28	0	0		0		1	0	0							
66	T5230/05	24	7	1	2			0	1	0	0											
67	T5258/05	60	8	2	2			0			0	0	1	0	0							
68	T5268/05	8	11	1	2																	
69	T5416/05	50	10	1	2			0	0	0	0											
70	T5433/05	40	6	1	2		2	0	0	0	0											
71	T5435/05	82	4	1	2																	
72	T5446/05	1	10	1	2	1		0	1	0	0	0	0	0	0							
73	T5458/05	62	8	1	2	1		0	1	0	0	0	0	0	0							
74	T5475/05	54	6	1	2	1		1	1	0	1	5	1	0	0							
75	T5493/05	54	9	2	2								1	0	0		1	1	0	0	0	1
76	T5508/05	54	10	1	2			1	1	0	0											
77	T5534/05	54	5	1	2	1	4	1	0	0	0	0	0	0	0							
78	T5915/05	25	11	2	2			0			0	1	1									
79	T5935/05	82	8	1	2	1		0	2	0	0		0	0	0							
80	T5996/05	28	10	2	2			0			0		1	0	0							
81	T6062/05	39	10	2	2			0			0		1	0	0							
82	T6104/05	54	10	2	2			0			0		1									
83	T6105/05	28	7	1	2			0	0	0	0											
84	T6526/05	49	11	2	2								1									
85	T6608/05	38	9	2	2			0			0		1	0	0							
86	T6645/05	84	9	1	2			0	0	0	0	0	1	0	0							
87	T6659/05	54	15	1	2			0	0	0	0		0	0	0							
88	T6712/05	54	8	1	2	1	6	0	0	0	0	0	1	0	0							
89	T6966/05	31	8	1	2	1				0	0		0	0	0							
90	T6970/05	6	10	2	2			0			0		1									
91	T7048/05	75	9	1	2			0	0	0	0		1									
92	T7236/05	54	6	1	2		16	0	2	0	0		0	0	0							
93	T7357/05	5	9	2	2			0			0		1	0	0							
94	T7361/05	23	12	1	2	1	24	0	1	0	0	2	0	0	0							
95	T7369/05	13	10	1	2			0		0	0		0	0	0							
96	T7490/05	47	8	1	2	1	20	0	0	2	0	0	1	0	0							
97	T7595/05	54	14	1	2																	
98	T7613/05	17	9	2	2			0			0	0	1									
99	T7854/05	21	7	1	2																	
100	T7864/05	3	8	1	2								1									

Fortsetzung 6 Tabelle 45

Nr	II _{Ms}	II _{Bd}	II _{Bn}	II _{Neo}	II _{np}	II _{Lf}	II _{Wei}	Ir _{Ms}	Ir _{Bd}	Ir _{Bn}	Ir _{Neo}	Imp	Ir _{Lf}	Ir _{Wei}	T1A	T1BpSt	T1BpD
51								60	0	2	0	0	0	4	3	0	0
52	10	0	4	0	0		8								4	1	0
53	20	0	0	0	0	0	8								3	1	0
54								1	0	4	0	0	0	8	2	1	0
55								30	0	0	0	0	0	8	2	0	0
56								60	0	0	0	0	0	0	2	1	0
57															4	0	0
58								0	0	5	0	0		1	4	3	0
59	1	0	0	0	0	0	4								4	1	0
60								0,1	0	5	0	0	0	8	4	1	0
61	60	0	2	0	0	1	4								4	4	2
62								10	0	4	0	0	0	8	2	1	0
63	1	0	0	0	0		4								10	0	0
64	50	0	3	0	0	0	8								3	0	0
65	60	1	3	0	0		8								3	2	0
66	0,1	0	0	0	0		8								2	0	0
67								1	0	0	0	0		8	5	1	0
68								1	0	0	0	0	0	1	1	0	0
69	40	0	0	0	0	0	1								5	0	0
70	1	0	0	0	0		1								3	0	0
71	0,1	0	2	0	0	0	8								3	0	0
72	10	0	0	0	0	1	1								3	0	0
73								0	0	0	0	0		8	4	0	0
74	1	0	0	0	0	0	0								2	0	0
75															4	0	0
76	1	0	0	0	0		1								2	1	0
77								1	0	0	0	0	1	1	2	0	0
78								20	0	0	0	0		1	5	0	0
79	0	0	0	0	0	0	8								7	0	0
80	10	0	2	0	0		1								2	3	0
81								0,1	0	0	0	0		8	3	1	0
82								10	0	0	0	0		0	6	2	0
83	30	0	0	0	0		8								6	1	0
84	40	0	0	0	0		8								2	1	0
85	0,1	0	0	0	0	0	8								4	1	0
86	0	0	0	0	0	0	1								1	0	0
87								10	0	0	0	0	0	1	3	0	0
88	0	0	0	0	0	0	8								3	0	0
89	0,1	0	1	0	0	0	8								4	1	0
90	0	0	0	0	0	0	0								2	0	0
91	10	0	0	0	0		1								2	1	0
92								50	1	4	0	0	1	1	2	3	0
93								0,1	0	1	0	0		8	4	0	0
94	10	0	0	0	0		0								2	0	0
95	20	0	0	0	0	0	8								2	0	0
96								30	0	0	0	0		8	4	0	0
97	50	0	0	0	0	0	0								1	2	0
98	20	0	0	0	0		8								3	0	0
99	30	0	0	0	0		1								2	0	0
100								40	0	0	0	0	1	8	1	0	0

Fortsetzung 7 Tabelle 45

Nr	T1BpZ	T1BpSe	T1LfD	T1LfZ	T1LfSe	T2A	T2BpSt	T2BpD	T2BpZ	T2BpSe	T2LfD	T2LfZ	T2LfSe	T3A
51	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	
52	0	0				3	3	0	1	0				
53	1	0	0	1	0	3	0	0	0	0				3
54	0	0	0	1	1	2	0	0	0	0				
55	0	0				1	0	0	0	0	0	0	0	
56	0	1	0	0	0									
57	0	0				2	1	0	0	0				2
58	2	0				2	0	0	0	0				
59	1	0	0	0	1									
60	0	0	0	0	1									
61	2	0	0	1	1									
62	0	0	0	0	1									
63	0	0				2	0	0	1	0				
64	0	0	0	0	1									
65	0	0												
66	0	0												
67	0	0												
68	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0				
69	0	0				1	0	0	0	0	0	0	0	
70	0	0				2	0	0	0	0				5
71	0	0	0	1	1									
72	0	0	0	0	0									
73	0	0				2	0	0	0	0				4
74	0	0				5	0	0	0	0	0	0	0	
75	0	0												
76	0	0												
77	0	0	0	1	1									
78	0	0				2	3	2	0	0				2
79	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0				2
80	2	1				4	2	0	0	1				
81	0	0				2	0	0	0	0				
82	1	0												
83	0	0				5	1	0	0	0				
84	0	2				3	0	0	0	0				
85	0	0	0	0	0									
86	0	0	0	0	0									
87	0	0	0	1	1									
88	0	0	0	1	1									
89	0	0				0	1	0	0	0	0	1	1	
90	0	0	0	0	0									
91	0	0				5	0	0	0	0				5
92	0	0	0	0	0									
93	0	0												
94	0	0				1	0	0	0	0				
95	0	0				5	0	0	0	0	0	0	1	
96	0	0				11	0	0	0	0				
97	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0				
98	0	0												
99	0	0				5	0	0	0	0				3
100	0	0	0	0	0									

Fortsetzung 8 Tabelle 45

Nr	T3BpSt	T3BpD	T3BpZ	T3BpSe	T3LfD	T3LfZ	T3LfSe	T4A	T4BpSt	T4BpD	T4BpZ	T4BpSe	T5A	T5BpSt
51														
52														
53	2	1	1	0				3	4	3	0	0	3	3
54														
55														
56														
57	0	0	0	0				2	1	0	0	0	2	2
58														
59														
60														
61														
62														
63														
64														
65														
66														
67														
68														
69														
70	0	0	0	0										
71														
72														
73	1	0	0	0				2	0	0	0	0		
74														
75														
76														
77														
78	1	0	0	0				4	0	0	0	0	3	2
79	2	0	1	0										
80														
81														
82														
83														
84														
85														
86														
87														
88														
89														
90														
91	0	0	0	0										
92														
93														
94														
95														
96														
97														
98														
99	4	0	0	0										
100														

Fortsetzung 9 Tabelle 45

Nr	T5BpD	T5BpZ	T5BpSe	T6A	T6BpSt	T6BpD	T6BpZ	T6BpSe	MmBpSt	MmBpD	MmBpZ	MmBpSe	MmLfSe
51									3	1	0	1	0
52									0	0	0	0	
53	0	0	0	3	1	0	0	0	4	0	0	3	
54									1	0	0	0	
55									1	0	0	0	
56									1	0	0	0	
57	0	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	1	
58									1	0	0	0	
59									3	1	3	1	
60													
61									4	0	0	3	
62									3	1	2	2	0
63									1	0	0	1	
64									1	0	0	0	0
65									4	0	1	1	
66									1	0	0	0	
67									3	0	0	1	
68									1	0	0	1	0
69									1	0	0	1	
70									3	1	1	1	
71													
72									4	1	1	0	
73									0	0	0	0	
74									3	0	0	0	
75													
76									2	0	0	1	
77									1	0	0	0	
78	0	0	0						0	0	0	0	
79									3	0	0	0	0
80									1	0	1	0	
81									0	0	0	0	
82													
83									0	0	0	0	
84									3	0	0	1	
85									0	0	0	0	
86									0	0	0	0	
87									1	0	0	0	
88									0	0	0	0	
89									0	0	0	0	
90													
91									1	0	0	0	
92									1	0	0	0	0
93									0	0	0	0	
94									1	0	0	0	
95									1	0	0	0	1
96									4	3	0	3	
97									2	0	0	0	0
98													
99									2	0	0	1	
100													

9.2.2. Tabellarische Erfassung aller Daten der Kontrollen (Hunde ohne Mammatumoren)

Tabelle 46: Tabellarische Erfassung aller Daten der Kontrollen

Nr	T-Nr	Ras	Alt	Ge	Ge.r	Lä	Zä	Gra	St	Lu	Agra	Ho	Er	Sys	Bl	Zbl	Wei	Tod	Fri	IIms	IIbD	IIbN	IINeo	IInp
1	S382/05	73	6	1	2		3			0				1			4	1	2					
2	S384/05	30		4	2								1	0					4	20	0	0	0	0
3	S385/05	17	0,21	1	1									0				2	1	0	0	1	0	0
4	S418/05	68	8	1	2								0	2				1	3	60	0	3	0	0
5	S420/05	30	8	3	2									0				1	3	0	0	3	0	0
6	S487/05	55	0,13	3	2							1	0	0	0			2	3	0,1	0	1	0	1
7	S516/05	2	7	2	2								1	1,5	1	14		1	2	30	0	0	0	0
8	S517/05	7	5	2	2			0			0		1	0	0			2		0	0	0	0	0
9	S520/05	35	6	2	2								1	0				1		1	0	0	0	0
10	S542/05	56		4	2								1	0					3	0	0	0	1	0
11	S551/05	26	4	3	2							0	0	0	0			2	1	0,1	0	2	0	0
12	S558/05	65	9	3	2								1	0				1	2	0,1	0	3	0	0
13	S573/05	23	6	1	2		12			0				0				2	2	10	0	0	0	0
14	S579/05	82	0,17	1	1									0				1	1					
15	S594/05	54	0,17	3	1							0	0	0	0			1		0	0	0	0	0
16	S599/05	66	7	4	2								1	5				1	3	0,1	0	3	0	0
17	S619/05	78	5	1	2		4							3			5	2	3	0	0	0	0	0
18	S620/05	54	7	4	2								1	0				1	2	0	0	0	0	0
19	S674/05	68	4	3	2							3	1	0				1	3	0	0	0	0	0
20	S714/05	10	7	2	2								1	1	1	4		1	1					
21	S716/05	68	5	1	2		3			0				0				1	3	1	0	0	0	0
22	S718/05	54	7	2	2							1	1	0				2	1	10	0	0	0	0
23	S720/05	59	0,17	3	1							0	0	0	0					0	0	0	0	0
24	S722/05	15	1,5	1	2									0				2						
25	S743/05	62	9	4	2								1	0				2		10	1	0	0	0
26	S751/05	46	2	3	2									0				1	2	10	0	3	0	0
27	S754/05	54	1,5	1	2									0				1		0	0	0	0	0
28	S773/05	68	2	3	2							0	0	0	0			2	2	1	0	1	0	0
29	S774/05	32	0,25	3	1								0	0	0					0	0	3	0	0
30	S780/05	54	0,33	3	1								1	4	1	14				0	0	0	0	0
31	S828/05	28		4	2								1	0				1	2	30	0	0	0	0
32	S839/05	83	1	1	2	1	0	0	0	0	0		0	0	0			2	1	1	0	0	0	0
33	S840/05	82	9	2	2								1	1				2		0,1	0	3	0	0
34	S851/05	33	2	1	2								1	1,5				1						
35	S857/05	85	3	1	2									0	1	6		1		30	0	0	0	0
36	S903/05	28	7	2	2			0				1	0	0	0			2	2	10	0	0	0	0
37	S929/05	48	0,25	1	1									0				1	4	0	0	0	0	1
38	S937/05	63	13	1	2									0				1	4	20	0	0	0	0
39	S988/05	20	0,08	3	1									0				2	2	0	0	0	0	0
40	S994/05	51	0,29	3	1							0	0	4	0			2	2	0	0	0	0	0
41	S1004/05	44	10	3	2							4	0	0	0			2	3	0,1	0	0	0	0
42	S1005/05	47	5	3	2								1	5				2	2	1	0	0	0	0
43	S1006/05	11	0,33	1	1					0				2				1	2	0	0	0	0	0
44	S1008/05	4	9	3	2								1	0				2	1	10	0	3	0	0
45	S1018/05	72	11	4	2									0				2	2					
46	S1034/05	10	11	1	2									3,5				2	2	90	1	1	0	0
47	S1043/05	52	0,25	3	1									0				2	1	0	0	0	0	0
48	S1055/05	55	0,42	1	1							0	0	0	0			2	2	0	0	0	0	0
49	S1094/05	54	3	4	2								1	0				1	2	0	0	0	0	0
50	S1228/05	30	0,42	3	1									1				1	2	0	0	1	0	0

Fortsetzung 1 Tabelle 46

Nr	IIIf	IIWei	IrMs	IrBd	IrBn	IrNeo	Imp	IrLf	IrWei	MIMs	MIBd	MIBn	MINeo	Minp	MILf	MIWei	MrMs	MrBd
1			0,1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	1	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	10	0
3		1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
4		0	50	0	0	0	0		0	80	0	0	0	0		0	50	1
5		0	0	0	3	0	0		0								30	0
6	0	8	0	0	0	0	1	0	8	0,1	0	0	0	0	0	0	0,1	0
7		0	0,1	0	0	0	0		0	30	0	0	0	0		0	0,1	0
8		0	0	0	0	0	0		0									
9		0	1	0	0	0	0		0	50	0	0	0	0		8	30	0
10		0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	1	0		0	0	0
11		0								0	0	0	0	0		0	0,1	0
12		0	0,1	0	2	0	0		0	0,1	0	1	0	0		0	5	0
13		0	1	0	0	0	0		0	20	0	0	6	0		0	1	0
14			0	0	0	0	1		8	0	0	0	0	0	1	0	0	0
15		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
16		0								0,1	1	1	0	0		8	30	1
17	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0
18		0	0	0	0	0	0		0	0	0	4	0	0		0	0	0
19		1	0	0	0	0	0		0	10	0	0	0	0		0	10	0
20			30	0	0	0	0		0	10	0	0	6	0		0	20	0
21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	1	0	8	0,1	0
22		0	40	0	0	0	0		0	80	0	0	0	0		0	70	0
23		8								0	0	0	0	0		8	0	0
24			0	0	2	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
25		0	10	0	0	0	0		0								1	0
26		0	10	0	0	0	0		0	40	0	0	0	0		0	10	0
27		8	0	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0		8	70	0
28		0	1	0	1	0	0		0	0,1	0	0	0	0		8	0,1	0
29		0	0	0	2	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
30		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
31		0	50	0	0	0	0		0	70	1	0	0	0		4	50	1
32		3	0	0	0	0	0		8	0	0	0	0	0		4	0	0
33		0	0,1	0	5	0	0		0	20	0	3	0	0		0	60	1
34			0,1	0	2	0	0		2	0,1	0	0	0	0		2	0,1	0
35		0	30	1	0	0	0		0									
36		0	10	0	0	0	0		0	20	0	0	0	0		0	10	0
37	0	8	0,1	0	2	0	1	0	8	0,1	0	0	0	1	0	8	0,1	0
38		0	10	0	0	0	0		0	30	1	0	0	0		0	50	0
39		0								0	0	0	0	0		0	0	0
40		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
41		0	0,1	0	2	0	0		0	50	0	0	0	0		0	1	0
42		8	10	0	0	0	0		3	20	0	0	0	0		8	70	0
43		1	0	0	0	0	0		1	0,1	0	0	0	0		0	0	0
44		0	10	0	0	0	0		0	30	0	0	0	0		8	20	0
45			0	0	0	0	1	0	8	1	0	0	0	0	0	8	0,1	0
46		0	90	1	1	0	0		0	10	1	0	0	0		0	20	1
47		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
48		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
49		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	1	0		0	0	0
50		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		1	0	0

Fortsetzung 2 Tabelle 46

Nr	MrBn	MrNeo	Mmp	MrLf	MrWei	AIMs	AlBd	AlBn	AlNeo	Alnp	AlLf	AlWei	ArMs	ArBd	ArBn	ArNeo	Amp
1	0	0	0	0	0								0	1	0	0	0
2	0	0	1	0	8	10	0	0	0	0		0	30	0	0	0	0
3	0	0	0		0	1	0	0	0	0		1	1	0	1	0	0
4	0	0	0		0	20	0	1	0	0		0	60	0	0	0	0
5	0	0	0		1								30	0	1	0	0
6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
7	0	0	0		0	10	1	0	0	0		0	10	1	0	0	0
8						0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
9	0	0	0		0	30	0	1	0	0		0	30	0	2	0	0
10	0	1	0		0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	1	0
11	1	0	0		3	0	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0
12	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0
13	0	0	0		0	1	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0
14	0	0	1	1	8	0	0	0	0	1	1	8					
15	2	0	0		0	0	0	0	0	0		4	0	0	0	0	0
16	0	0	0		8	1	0	2	0	0		3	0	0	1	0	0
17	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
18	0	0	0		0	0	0	0	0	0		8	0,1	0	2	0	0
19	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0
20	2	0	0		0	10	0	0	6	0		0	0,1	0	2	6	0
21	0	0	1	0	8	1	0	4	0	1	0	8	1	0	0	0	0
22	0	0	0		0	70	0	0	0	0		0	80	0	0	0	0
23	0	0	0		8	0	0	0	0	0		8	0	0	0	0	0
24	0	0	0		0								0	0	0	0	0
25	0	0	0		0	10	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0
26	0	0	0		0												
27	0	0	0		8	30	1	0	0	0		5	50	0	0	0	0
28	0	0	0		0	10	0	2	0	0		3	1	0	2	0	0
29	0	0	0		0	0,1	0	4	0	0		0	0,1	0	4	0	0
30	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0
31	0	0	0		0	10	0	0	0	0		1					
32	0	0	0		4	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0
33	0	0	0		4	50	1	3	0	0		4	30	0	2	0	0
34	0	0	0		2	1	0	2	0	0		2	20	0	0	0	0
35						10	0	0	0	0		0	50	0	0	0	0
36	0	0	0		0	1	0	0	0	0		0	10	0	0	0	0
37	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	0	8	0,1	0	2	0	1
38	0	0	0		0	20	0	0	0	0		0	10	0	0	0	0
39	0	0	0		0								0	0	0	0	0
40	0	0	0		3	0,1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
41	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		4					
42	0	0	0		8	10	0	0	0	0		0	20	0	0	0	0
43	0	0	0		1	0	0	0	0	0		1	0,1	0	0	0	0
44	0	0	0		1	10	0	0	0	0		1	10	0	0	0	0
45	0	0	0	0	8	0,1	0	0	0	0	0	6	0,1	0	0	0	0
46	0	0	0		3	90	0	0	0	0		0	80	0	0	0	0
47	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
48	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
49	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
50	0	0	0		1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0

Fortsetzung 3 Tabelle 46

Nr	ArLf	ArWei	MiMs	MiBd	MiNeo	Minp	MiLf	MiWei	MaMs	MaBd	MaBn	MaNeo	Manp	MaLf	MaWei
1	0	0	0,1	0	0	0	0	8	0	0	1	0	0	0	0
2		0	1	0	0	0	1	8	40	0	0	0	0	0	0
3		8	0	0	0	0		7	0,1	0	3	0	0		1
4		0	10	1	0	0		3	60	1	0	0	0		0
5		0	0,1	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0
6	0	0	0,1	0	0	0		3	0	0	0	0	0		8
7		0							70	1	0	0	0		0
8		0	0	0	0	0		3	0	0	0	0	0		0
9		4	0,1	0	0	0		3	0	0	3	0	0		0
10		0	10	0	1	0		1	0	0	4	1	0		0
11		0	0	0	0	0		0	0	0	5	0	0		0
12		0	20	0	0	0		3	0	0	0	0	0		1
13		0	20	0	6	0		0	0,1	0	0	0	0		0
14			0,1	0	0	0		1	0	0	2	0	0		1
15		4	0	0	0	0		0	0	0	3	0	0		0
16		0	40	0	0	0		8	1	0	5	0	0		0
17	0	2	0	0	0	0		0	0	0	4	0	0		8
18		8	0,1	0	0	0	1	8	0	0	0	0	1	0	8
19		0	10	0	0	0		3	0	0	0	0	0		1
20		0	5	0	6	0		8	10	0	5	6	0		0
21	0	8	0	0	0	0		7	0	0	2	0	0		0
22		0	30	1	0	0		0	20	1	4	0	0		0
23		8	0,1	0	0	0		8	0	0	0	0	0		8
24		0	0,1	0	0	0		0	0	0	3	0	0		1
25		0	10	0	0	0		0	1	0	0	0	0		1
26			30	0	0	0		8	1	0	4	0	0		1
27		0	1	0	0	0		0	0,1	0	3	0	0		5
28		0	10	0	0	0		8	1	0	0	0	0		8
29		0	0,1	0	0	0		8	0	0	4	0	0		0
30		0	0	0	0	0		8	0	0	3	0	0		0
31			20	0	0	0		0	10	1	4	0	0		1
32		8	0,1	0	0	0		8	0	0	3	0	0		6
33		0	0,1	0	0	0		0	0	0	4	0	0		3
34		8	50	0	0	0		8	1	0	4	0	0		2
35		4	0,1	0	0	0		0	0,1	0	3	0	0		1
36		0	1	0	0	0		3	1	0	3	0	0		5
37	0	8	0	0	0	0		8	0	0	4	0	0		0
38		0	40	0	0	0		3	0,1	0	0	0	0		5
39		0	0	0	0	0		7	0	0	3	0	0		0
40		0	0	0	0	0		8	0	0	0	0	0		0
41			20	1	0	0		8	0,1	0	2	0	0		0
42		0	5	0	0	0		3	10	0	0	0	0		3
43		1	0	0	0	0		8	0	0	0	0	0		1
44		0	40	0	0	0		3	10	0	4	0	0		1
45	0	0	1	0	0	0		8	0	0	1	0	0		0
46		0	10	0	0	0		7	1	0	0	0	0		0
47		0	0	0	0	0		3	0	0	2	0	0		1
48		0	0,1	0	0	0		8	0	0	0	0	0		0
49		0	0	0	0	0		3	0	0	4	0	0		0
50		3	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0

Fortsetzung 4 Tabelle 46

Nr	T-Nr	Ras	Alt	Ge	Ge.r	Lä	Zlä	Gra	St	Lu	Agra	Ho	Er	Sys	Bl	Zbl	Wei	Tod	Fri	II Ms	II Bd	II Bn	II Neo	II np
51	S1260/05	18	8	3	2								1	3				2	2	30	1	0	0	0
52	S1269/05	10	9	1	2		8						0	0				1	2					
53	S1272/05	82	9	3	2							1	1	0				1	2					
54	S1278/05	29	6	2	2			0			0	1	1	0	0			2		10	0	1	0	0
55	S1292/05	28	0,17	3	1							1	0	0	0			1		0	0	0	0	0
56	S1293/05	10	8	4	2							1	1	0				1	1	1	0	0	0	0
57	S1312/05	29	9	2	2								1	1				2	1	1	0	0	0	0
58	S1317/05	45	6	3	2									0				2	3	0,1	0	0	0	0
59	S1338/05	32	4	1	2	1		0	2	0	0	0	0	0	0			1	3					
60	S1356/05	68	9	1	2									0				1	2	0,1	0	1	0	0
61	S1359/05	85	0,33	3	1									0				2	1	0	0	0	0	0
62	S1361/05	54	8	3	2									0				1		0,1	0	1	0	0
63	S1365/05	28	10	4	2								1	0				1						
64	S1369/05	68	7	3	2									0				1	1	0,1	0	0	0	0
65	S1389/05	10	1,5	3	2								1	0				1		0,1	0	1	0	0
66	S1409/05	54	0,42	1	1							0	0	0	0			2	2	0	0	0	0	0
67	S1423/05	24	10	3	2									0				2	2	30	0	0	0	0
68	S1466/05	47	0,21	1	1							0	1	4	1	0,5		2	2	0	0	0	0	0
69	S1472/05	22		4	2								1	0				1	2	0,1	0	0	1	0
70	S1479/05	43	0,17	1	1							0	0	0	0			2	3	0	0	0	0	0
71	S1480/05	55	0,17	3	1							0	0	0	0			2		0	0	0	0	0
72	S1492/05	28	7	4	2								1	0				1	1	60	0	1	3	0
73	S1497/05	47	12	3	2									0				1	1	20	0	0	0	0
74	S1508/05	79	6	3	2									0				2	2	0,1	0	1	0	0
75	S1538/05	47	7	4	2								1	5	1	0,5		2		10	1	1	0	0
76	S1547/05	38	10	3	2									0				2	2					
77	S1560/05	68	12	2	2			0			0	0	1	0	0			1		1	0	0	0	0
78	S1562/05	66	12	2	2								1	0				1						
79	S1573/05	71	0,17	1	1							0	0	0	0			2	2	1	0	0	0	0
80	S17/06	54	12	2	2								1	0				1						
81	S47/06	54		4	2								1	0					2	0	0	0	1	0
82	S52/06	38	10	1	2									0				2	1	0,1	0	0	0	0
83	S71/06	69	5	1	2		6							3				1		0,1	0	0	7	0
84	S73/06	82	3	1	2		8	1	0	0	0			0			6	2	1	0	0	1	0	0
85	S75/06	80	0,13	3	1									0				1	1					
86	S76/06	28	2,5	1	2								1	0				1	2	0,1	0	0	0	0
87	S86/06	68	10	2	2								1	0				2	3	50	0	0	0	0
88	S91/06	41	9	2	2								1	0				2	2	80	1	0	0	0
89	S169/06	54	12	2	2			0			0		1	0	0			2	4	10	0	1	0	0
90	S229/06	13	0,58	2	1								1	0				1	2	0,1	0	0	0	0
91	S244/06	54	15	3	2									0				1		40	0	3	0	0
92	S245/06	37	0,21	3	1									0				2						
93	S285/05	79	8	1	2								1	0					2	0,1	0	0	0	0
94	S299/06	47	1,5	1	2								1	0	1	1		2	3	0,1	0	0	0	0
95	S315/06	6	1,08	1	2					1				0				1	1	0,1	0	0	0	0
96	S331/06	54	0,25	2	1								1	0				1	1	0	0	0	0	0
97	S457/06	54	7	3	2								1	0				1	1	40	0	0	0	0
98	S458/06	37		3	2									0				2	3	0,1	0	0	0	0
99	S472/06	28	8	2	2								1	0				1	3	10	0	0	0	0
100	S473/06	10	9	1	2									0				1	1	40	0	0	0	0

Fortsetzung 5 Tabelle 46

Nr	IIIf	IIWei	IrMs	IrBd	IrBn	IrNeo	Imp	IrLf	IrWei	MIMs	MIBd	MIBn	MINeo	MImp	MILf	MIWei	MrMs	MrBd
51		0	0	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0		3	1	0
52			30	0	0	0	0		0	40	1	0	0	0		0	70	0
53			1	1	4	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0
54		0	1	0	0	0	0		0	60	0	0	0	0		0	50	0
55		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
56		0	30	0	0	0	0		3	80	1	0	6	0		4	30	1
57		0	10	0	0	0	0		0	60	0	0	0	0		0	70	0
58		0	10	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0
59			20	0	0	0	0		1	10	1	2	0	0		8	10	0
60		0	1	0	1	0	0		0	20	0	1	0	0		0	30	0
61		0								0,1	0	0	0	0		4	0,1	0
62		4	10	1	1	0	0		0	1	0	0	0	0		4	10	1
63			1	0	0	0	0		0	30	0	0	0	0		0	70	0
64		0	0,1	0	0	0	0		0	10	0	0	0	0		8	10	0
65		2	0,1	0	0	0	0		2	1	0	0	0	0		2	1	0
66		0								0,1	0	0	0	0		0	0,1	0
67		0								50	1	0	0	0		0	30	1
68		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
69		0	0,1	0	0	1	0		0	1	1	0	1	0		0	1	1
70		1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
71		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		1	0	0
72		1	60	0	0	3	0		0	80	1	0	3	0		0	80	0
73		0	1	0	1	0	0		0	70	0	0	0	0		4	50	0
74		1								0,1	0	0	0	0		0	0,1	0
75		4								30	1	0	0	0		8	30	0
76			1	0	1	0	0		0	10	0	0	0	0		0	30	0
77		0	1	0	1	0	0		0	10	0	0	0	0		8	30	0
78			0	0	2	0	0		0								20	0
79		1	0	0	0	0	0		1	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0
80			0,1	0	0	0	0		0	10	0	0	0	0		4	10	0
81		1								0	0	0	1	0		0	0	0
82		0	30	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0		0	10	0
83		0	0,1	0	0	7	0		0	0,1	0	0	7	0		0	1	0
84	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0
85			0,1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0
86		4	1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		4	0,1	0
87		0	50	0	0	0	0		0	10	1	5	0	0		0	80	1
88		0	70	1	0	0	0		0	40	1	0	0	0		0	50	1
89		8	20	0	0	0	0		0	70	0	0	0	0		8	80	0
90		0	0	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0
91		0	30	0	3	0	0		0	80	0	0	0	0		4	70	0
92			0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0
93		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		2	0	0
94		8	0,1	0	0	0	0		4	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0
95	0	0	0,1	0	0	0	0	1	4	0	0	0	0	0	1	0	0,1	0
96		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		1	0,1	0
97		0	40	0	0	0	0		0	40	0	0	0	0		0	40	0
98		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0
99		0	10	0	0	0	0		0	20	0	0	0	0		4	30	0
100		0								40	0	0	0	0		6	50	0

Fortsetzung 6 Tabelle 46

Nr	MrBn	MrNeo	Mmp	MrLf	MrWei	AlMs	AlBd	AlBn	AlNeo	Alnp	AlLf	AlWei	ArMs	ArBd	ArBn	ArNeo	Amp
51	0	0	0		0	0,1	0	1	0	0		0	0,1	0	3	0	0
52	0	0	0		0	60	1	0	0	0		0	20	0	0	6	0
53	0	0	0		0								1	0	0	2	0
54	0	0	0		0	40	0	0	0	0		0	70	0	0	0	0
55	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
56	0	6	0		4	40	1	0	6	0		0	0,1	0	0	6	0
57	0	0	0		0	70	0	0	0	0		0	60	0	0	0	0
58	0	0	0		4	20	0	0	0	0		4	20	0	0	0	0
59	0	0	0		8	10	0	0	0	0		1	10	0	0	0	0
60	1	0	0		0	20	0	0	0	0		0	10	0	1	0	0
61	1	0	0		8	0,1	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0
62	0	0	0		8	1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0
63	0	0	0		0	30	0	0	0	0		0	40	0	0	0	0
64	0	0	0		8	0,1	0	1	0	0		0	0,1	0	2	0	0
65	0	0	0		2	1	0	0	0	0		2	10	0	0	0	0
66	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
67	0	0	0		8	40	1	1	0	0		0	50	0	0	0	0
68	0	0	0		0	0	0	0	0	0		8	0	0	0	0	0
69	0	1	0		0	1	1	0	1	0		0	0,1	0	0	1	0
70	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
71	0	0	0		1	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
72	0	3	0		0	70	0	0	0	0		0	60	1	0	0	0
73	0	0	0		8	1	0	0	0	0		0	1	0	0	0	0
74	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		1	0	0	0	0	0
75	1	0	0		8	50	1	0	0	0		0	50	1	0	0	0
76	0	0	0		0	50	0	0	0	0		0	40	0	0	0	0
77	0	0	0		2	20	0	0	0	0		2	10	0	0	0	0
78	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0	2	0	0
79	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
80	0	0	0		0	1	0	0	0	0		0	40	0	0	0	0
81	0	1	0		0	0,1	0	0	1	0		0	0,1	0	0	1	0
82	0	0	0		4	0,1	0	0	0	0		1	30	0	0	0	0
83	0	7	0		4	0,1	0	0	7	0		0	1	0	0	7	0
84	0	0	0	0	8	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
85	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0
86	0	0	0		4	0,1	0	0	0	0		1	0,1	0	0	0	0
87	1	0	0		0	40	1	0	0	0		3	70	0	1	0	0
88	0	0	0		0	1	0	0	0	0		0	20	0	0	0	0
89	0	0	0		6	90	0	0	0	0		2					
90	0	0	0		8	0,1	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
91	0	0	0		0	60	0	0	0	0		0	50	0	0	0	0
92	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0
93	0	0	0		2								0,1	0	0	0	0
94	0	0	0		1	0,1	0	0	0	0		4	0,1	0	0	0	0
95	0	0	0	1	5	0	0	0	0	0	1	0	0,1	0	0	0	0
96	0	0	0		0	0	0	0	0	0		1	0,1	0	0	0	0
97	0	0	0		0	40	0	0	0	0		0	40	0	0	0	0
98	0	0	0		2	0,1	0	1	0	0		0	0,1	0	0	0	0
99	0	0	0		4	20	0	0	0	0		3	30	0	0	0	0
100	0	0	0		6	50	0	0	0	0		6	60	0	0	0	0

Fortsetzung 7 Tabelle 46

Nr	ArLf	ArWei	MiMs	MiBd	MiNeo	Minp	MiLf	MiWei	MaMs	MaBd	MaBn	MaNeo	Manp	MaLf	MaWei
51		0	10	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0
52		0	10	0	6	0		0	1	0	0	0	0		0
53		0	10	0	0	0		3	0	0	2	2	0		0
54		0	40	0	0	0		0	1	0	0	0	0		0
55		0	0	0	0	0		8	0	0	0	0	0		1
56		0	20	0	6	0		0	50	0	0	0	0		3
57		0	0,1	0	4	0		0	0,1	0	0	0	0		3
58		0	20	0	0	0		0	0,1	0	3	0	0		0
59		1	70	0	0	0		0	0,1	0	5	0	0		1
60		0	10	0	0	0		0	0,1	0	1	0	0		8
61		8	0	0	0	0		0	0	0	1	0	0		0
62		4	10	0	0	0		3	0,1	0	2	0	0		4
63		0	30	0	0	0		0	0,1	0	1	0	0		0
64		0	1	0	0	0		3	1	0	4	0	0		1
65		2	1	0	0	0		3	0,1	0	3	0	0		2
66		0	0	0	0	0		0	0	0	1	0	0		0
67		0	10	0	0	0		8	0,1	0	0	0	0		8
68		3	0	0	0	0		8	0	0	0	0	0		8
69		0	1	0	0	0		0	0	0	0	1	0		0
70		1	0	0	0	0		8	0	0	0	0	0		1
71		0	0	0	0	0		3	0	0	0	0	0		1
72		1	30	0	0	0		0	40	0	3	0	0		1
73		0	1	0	0	0		0	1	0	3	0	0		1
74		0	10	0	0	0		8	0,1	0	4	0	0		1
75		0	10	0	0	0		8	1	0	0	0	0		0
76		0	50	0	0	0		8	0,1	0	3	0	0		0
77		2	1	0	0	0		8	0,1	0	2	0	0		0
78		0	0,1	0	0	0		8	0,1	0	5	0	0		1
79		1	0	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0
80		0	30	0	0	0		0	0,1	0	0	0	0		0
81		0	1	0	1	0		0	0,1	0	0	1	0		1
82		0	10	0	0	0		7	0,1	0	4	0	0		0
83		0	1	0	0	0		0	0	0	3	7	0		0
84	0	0	0,1	0	0	0		0	0	0	3	0	0		1
85		0	0	0	0	0		0	0	0	1	0	0		1
86		0	0,1	0	0	0		8	0,1	0	0	0	0		1
87		0	20	0	5	0		0	0,1	0	5	0	0		0
88		4	0,1	0	0	0		0	0,1	0	4	0	0		0
89			30	0	4	0		0	0,1	0	3	0	0		8
90		0	0	0	0	0		3	0	0	2	0	0		1
91		0	30	0	0	0		0	0,1	0	1	0	0		1
92		0	0	0	0	0		3	0,1	0	1	0	0		1
93		8	0,1	0	0	0		3	0	0	1	0	0		0
94		8	0,1	0	0	0		3	0	0	0	0	0		1
95	1	0	10	0	0	0	1	3	0,1	0	0	0	0	1	8
96		1	0,1	0	0	0		3	0	0	3	0	0		1
97		0	50	0	0	0		0	1	0	3	0	0		0
98		2	10	0	0	0		3	0	0	2	0	0		1
99		0	40	0	0	0		0	0,1	0	1	0	0		1
100		6	40	1	0	0		3	20	0	1	0	0		6

9.2.3. Tabellenschlüssel

<p><u>Nr.</u>: fortlaufende Tiernummer</p> <p><u>T-Nr.</u>: Tagebuchnummer</p> <p><u>Ras.</u>: Rasse (s. Rasseschlüssel, Kapitel 9.2.4.)</p> <p><u>Alt.</u>: Alter in Jahren</p> <p><u>Ge.</u>: Geschlecht:</p> <p>1: weiblich-intakt</p> <p>2: weiblich-kastriert</p> <p>3: männlich-intakt</p> <p>4: männlich-kastriert</p> <p><u>Ge.r.</u>: Geschlechtsreife:</p> <p>1: juvenil</p> <p>2: adult</p> <p><u>Lä.</u>: regelmäßige Läufigkeit:</p> <p>1: regelmäßig</p> <p>2: unregelmäßig</p> <p><u>Zlä.</u>: Zeit seit letzter Läufigkeit in Wochen</p> <p><u>Gra.</u>: frühere Graviditäten:</p> <p>0: nein</p> <p>1: ja</p> <p><u>St.</u>: Scheinträchtigkeiten:</p> <p>0: keine</p> <p>1: regelmäßig</p> <p>2: unregelmäßig</p> <p><u>Lu.</u>: Läufigkeitsunterdrückung:</p> <p>0: keine</p> <p>1: regelmäßig</p> <p>2: unregelmäßig</p> <p><u>Agra.</u>: Abbruch von Graviditäten:</p> <p>0: nein</p> <p>1: ja</p> <p><u>Ho.</u>: Hormonbehandlungen:</p> <p>0: nein</p> <p>1: Glukokortikoide</p> <p>2: Testosteron</p> <p>3: Tryptophan</p> <p>4: Gestagene</p>	<p>5: Östrogene</p> <p><u>Er.</u>: Erkrankungen im Einzugsgebiet der oberflächlichen Leistenlymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten</p> <p>0: nein</p> <p>1: ja (Dermatitis, Verletzungen, Laparotomie, Mammektomie)</p> <p><u>Sys.</u>: vorberichtlich genannte und postmortal festgestellte systemische Erkrankungen, die direkt mit dem Eisenstoffwechsel in Verbindung stehen:</p> <p>0: nein</p> <p>1: Anämie</p> <p>2: Schrumpfnieren</p> <p>3: aktiviertes Knochenmark</p> <p>4: Parvovirose</p> <p>5: Hämosiderose der Leber und/oder des Knochenmarks</p> <p><u>Bl.</u>: Bluttransfusion</p> <p>0: nein</p> <p>1: ja</p> <p><u>Zbl.</u>: Zeit seit letzter Transfusion in Tagen</p> <p><u>We.</u>: weiteres:</p> <p>1: Zuchthündin</p> <p>2: z.T. dauerhaft scheinträchtig</p> <p>3: im Alter keine Scheinträchtigkeit</p> <p>4: scheinträchtig seit 1,5 Wochen</p> <p>5: gravid seit 4 Wochen</p> <p><u>Tod.</u>: Todesart</p> <p>1: Euthanasie</p> <p>2: Exitus</p> <p><u>Fri.</u>: Frischegrad</p> <p>1: frisch</p> <p>2: relativ frisch</p> <p>3: nicht mehr frisch</p> <p>4: hgr. postmortale Veränderungen</p>
--	--

Fortsetzung des Tabellenschlüssels

<u>lub...</u> : oberflächlicher Leistenlymphknoten, unbekannte Körperseite	7: extramedulläre Hämatopoese 8: mehrere dieser Veränderungen
<u>...Ms</u> : Hämosiderosegrad der Lymphknoten in %	<u>ll...</u> : linker oberflächlicher Leistenlymphknoten
<u>...Bd</u> : hämosiderinhaltiges Bindegewebe:	<u>lr...</u> : rechter oberflächlicher Leistenlymphknoten
0: nein	<u>ml...</u> : linker mittlerer Darmbeinlymphknoten
1: ja	<u>mr...</u> : rechter mittlerer Darmbeinlymphknoten
<u>...Bn</u> : BBn-Pigment	<u>al...</u> : linker Achsellymphknoten
0: kein	<u>ar...</u> : rechter Achsellymphknoten
1: vereinzelt	<u>mi...</u> : Milz
2: wenig	<u>ma...</u> : Kehlgangslymphknoten
3: einiges	<u>T1...-T6...</u> : Mammatumor Anzahl 1 bis 6
4: viel	<u>...A</u> : Tumorart
5: sehr viel	1: einfaches Adenom
<u>...Neo</u> : Neoplasie	2: komplexes Adenom
0: keine	3: tubulopapilläres Karzinom
1: Lymphosarkom	4: komplexes Karzinom
2: Übergangszellkarzinom	5: benigner Misch tumor
3: Pankreaskarzinom	6: maligner Misch tumor
4: Hämangiosarkom	7: solides Karzinom
5: nicht klassifiziert	8: anaplastisches Karzinom
6: maligne Histiocytose	9: Fibroadenom
7: blastoide Rundzellen	<u>...Bp...</u> : Berliner Blau-positive Reaktion
<u>...np</u> : neutrophile Granulozyten	0: keine
0: keine	1: vereinzelte
1: neutrophile Granulozyten	2: wenige
<u>...Lf</u> : Laktoferrin	3: einige
0: negativ	4: viele
1: positiv	5: sehr viele
<u>...Wei</u> : weitere Veränderungen	<u>...St</u> : Makrophagen im Stroma
0: keine	<u>...D</u> : Drüsene epithelien
1: follikuläre Hyperplasie	<u>...Z</u> : Makrophagen im Drüsenlumen
2: Sinushistiocytose	<u>...Se</u> : Sekrets im Drüsenlumen
3: Hyperämie	<u>...Lf...</u> : Laktoferrin-Reaktion
4: Erythrozyten im Sinus	0: negativ
5: 3 und 4 und Erythrozyten im Gewebe	1: positiv
6: Sinusödem	<u>uM...</u> : unverändertes Milchdrüsengewebe

9.2.4. Rasseschlüssel

Nr.	Rasse	Nr.	Rasse	Nr.	Rasse	Nr.	Rasse
1	Afghane	22	Dalmatiner-Mischling	43	Irish Wolfhound	64	Rauhhaardackel
2	Airdale Terrier	23	Deutsch Drahthaar	44	Jack Russell Terrier	65	Rhodesian Ridgeback
3	Akita Inu	24	Deutsch Kurzhaar	45	Kanadischer Schäferhund-Mischling	66	Riesenschnauzer
4	Altdeutscher Schäferhund-Mischling	25	Deutsch Langhaar	46	Kangal	67	Riesenschnauzer-Mischling
5	American Bulldog	26	Deutsche Dogge	47	Labrador Retriever	68	Rottweiler
6	Australian Shepherd	27	Deutsche Wachtel	48	Labrador Retriever-Mischling	69	Schnauzer
7	Beagle	28	Deutscher Schäferhund	49	Langhaardackel	70	Schnauzer-Mischling
8	Bearded Collie	29	Deutscher Schäferhund-Mischling	50	Leonberger	71	Shih Tzu
9	Belgischer Schäferhund-Mischling	30	Dobermann	51	Magyar Vizsla	72	Spitz
10	Berner Sennenhund	31	Dobermann-Rottweiler-Mischling	52	Malinois	73	Staffordshire Bull Terrier
11	Bernhardiner	32	Dogge	53	Malteser	74	Terrier
12	Bordeaux Dogge	33	Entlebucher Sennenhund	54	Mischling	75	Tibet Terrier
13	Border Collie	34	Eurasier	55	Mops	76	Türkischer Hirtenhund
14	Border Collie-Mischling	35	Flat coated Retriever	56	Neufundländer	77	Unbekannt
15	Boston Terrier	36	Foxterrier	57	Papillon	78	Weimaraner
16	Boxer	37	Französische Bulldogge	58	Pekinese	79	Weißer Schäferhund
17	Cocker Spaniel	38	Golden Retriever	59	Pinscher	80	Welsh Terrier
18	Collie	39	Groenendael	60	Pit Bull Terrier	81	West Highland White Terrier
19	Collie-Mischling	40	Hovawart	61	Pointer-Mischling	82	Wolfsspitz
20	Coton de Tulear	41	Irish Setter	62	Pudel	83	Yorkshire Terrier
21	Dackel	42	Irish Terrier	63	Puli		

9.3. Abkürzungsverzeichnis

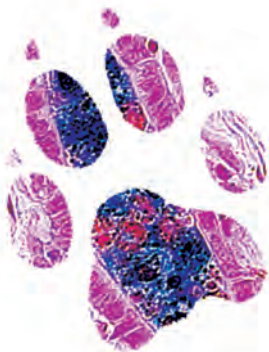
- A.: Aposiderin
- ABC: Avidin-Biotin-Komplex
- Ac.: Achsellymphknoten
- A.M.: arithmetischer Mittelwert
- BB.: Berliner Blau-positive(s)
- BBn-Pigment: intrazelluläres, Berliner Blau-negatives, braunes Pigment in caninen Makrophagen
- D: Daten vorhanden
- Da.: mittlere Darmbeinlymphknoten
- dest.: destillata
- DNS: Desoxyribonukleinsäure
- et al.: et alii
- EVO: Erkrankungen, Verletzungen oder Operationen im Einzugsgebiet der Lymphknoten, die Einfluss auf die Hämosiderinspeicherung haben könnten
- Fälle: Hunde mit Mammatumoren
- Gruppe 1: Fälle = Hunde mit Mammatumor
- Gruppe 2: Kontrollen = Hunde ohne Mammatumor
- Häm. Bdgw.: hämosiderinhaltiges Bindegewebe der Lymphknoten-/Milztrabekel
- Hgr.: hochgradige
- Ke.: Kehlganglymphknoten
- Kontrollen: Hunde ohne Mammatumoren
 - Kontrollen 1: alle untersuchten Hunde ohne Mammatumoren
 - Kontrollen 2: weibliche Hunde der Kontrollen ab einem Alter von 4 Jahren
- Ln.: Lymphonodus

- Le.: oberflächliche Leistenlymphknoten
- Lf.: Laktoferrin; Laktoferrin-positive(s)
- Li.: Lipofusazine
- Makr.: Makrophagen
- MPS: mononukleäres Phagozytensystem
- n =: Anzahl der Tiere/Lymphknoten/Milzen/Tumoren/unveränderten Milchdrüsen
- np. Gran.: neutrophile Granulozyten
- Oberfl.: oberflächliche
- Obj.: Objektivvergrößerung
- r_s : Spearman-Rangkorrelationskoeffizient
- TB.: Turnbills Blau-positive(s)
- u.: unverändertes
- u.M.: unverändertes Milchdrüsengewebe
- Weit.: weitere Veränderungen (follikuläre Hyperplasie, Sinushistiozytose, Hyperämie, Erythrozyten im Sinus, Hyperämie mit Erythrozyten im Sinus und Gewebe, Sinusödem, extramedulläre Hämatopoese)

Danksagung

Ich danke allen, die mir bei der Fertigstellung dieser Dissertation geholfen haben.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. M. Reinacher für die Bereitstellung des Themas und die fachliche Unterstützung, Herrn Dr. K. Failing und Frau M. Sparenberg für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung, Prof. Dr. Dr. S. Arnhold für das entgegengebrachte Interesse und den MitarbeiterInnen des Instituts für Veterinär-Pathologie sowie UI und meinen Eltern für ihre Unterstützung.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5506-3



9 783835 195506